

Hybrid interferons, their use as pharmaceutical compositions and as intermediate products for the preparation of antibodies and the use thereof and processes for preparing them

Patent Number: ☐ US4917887

Publication date: 1990-04-17

Inventor(s): ADOLF GUNTHER (AT); FALKNER EDGAR (AT); BODO GERHARD (AT); MEINDL PETER (AT); SWETLY PETER (AT); HAUPTMANN RUDOLF (AT); MAURER-FOGY INGRID (AT)

Applicant(s): BOEHRINGER INGELHEIM INT (DE)

Requested Patent: ☐ EP0236920, A3, B1

Application Number: US19870023634 19870309

Priority Number (s): DE19863607835 19860310

IPC Classification: A61K45/02; C07K13/00; C07K15/26; C12P21/00

EC Classification: C07K14/555, C12N15/70, C12N15/81, C07K14/56, C07K16/24H

Equivalents: AU600702, AU6978687, DD266118, ☐ DE3607835, DK120387, ES2052502T, FI871012, HU44074, IE60573, ☐ JP62282595, KR9508191, NO870967, NZ219549, ☐ PH27060, ☐ PT84427, SU1604164, ZA8701679

Abstract

This invention relates to new hybrid interferons consisting of part of an alpha-interferon and part of an omega interferon, the N-terminal Met or N-formyl-Met derivatives thereof and, if the peptide sequence of the hybrid interferon contains a glycosylation site, the N-glycosylated derivatives thereof, their use as pharmaceutical compositions and as intermediate products for immunizing experimental animals and processes for producing them, new monoclonal antibodies and their use in purifying alpha and omega-interferons, the hybrid cell lines which secrete them and processes for preparing them, a new process for purifying alpha and omega-interferons by means of a new antibody affinity column containing the above-mentioned new monoclonal antibodies, and processes for the preparation thereof, new hybrid plasmids for improving the expression of omega-interferons and new intermediate plasmids for preparing the new plasmids and processes for the preparation thereof.

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 236 920
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 87103030.0

(22) Anmeldetag: 04.03.87

(51) Int. Cl.³: C 12 N 15/00
C 12 P 21/02, A 61 K 45/02
C 12 N 1/20, C 12 N 5/00
C 07 K 15/26, C 07 K 3/18
C 07 K 17/00, C 07 K 15/00
C 12 P 21/00
/(C12N1/20, C12R1:19),
(C12P21/00, C12R1:91)

(30) Priorität: 10.03.86 DE 3607835

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
16.09.87 Patentblatt 87/38

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: Boehringer Ingelheim International G.m.b.H.
D-6507 Ingelheim am Rhein(DE)

(72) Erfinder: Hauptmann, Rudolf, Dr.
Döllachstrasse 22
A-2483 Ebreichsdorf(AT)

(72) Erfinder: Swetty, Peter, Prof. Dr.
Hietzinger Hauptstrasse 40 B,
A-1130 Wien(AT)

(72) Erfinder: Meindl, Peter, Dr.
Hockegasse 63/1,
A-1180 Wien(AT)

(72) Erfinder: Günther, Adolf, Mag. Dr.
Johannagasse 20/7,
A-1050 Wien(AT)

(72) Erfinder: Falkner, Edgar, Dr.
Strohberggasse 9,
A-1120 Wien(AT)

(72) Erfinder: Bodo, Gerhard, Prof. Dr.
Belghofergasse 27/5,
A-1120 Wien(AT)

(72) Erfinder: Maurer-Fogy, Ingrid, Dr.
Lindauergasse 35,
A-1238 Wien(AT)

(54) Hybridinterferone, deren Verwendung als Arzneimittel und als Zwischenprodukte zur Herstellung von Antikörpern und deren Verwendung sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.

(57) Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind neue Hybridinterferone, bestehend aus einem Teil eines α -Interferons und einem Teil eines omega-Interferons, deren N-terminale Met- oder N-Formyl-Met-Derivate und, falls die Peptidsequenz des Hybridinterferons eine Glykosylierungsstelle enthält, deren N-glykosylierte Derivate, deren Verwendung als Arzneimittel und als Zwischenprodukte zur Immunisierung von Versuchstieren sowie Verfahren zu ihrer Herstellung, neue monoklonale Antikörper und deren Verwendung zur Reinigung von α - und omega-Interferonen, die sie sezernierende Hybridzelllinien und Verfahren zu ihrer Herstellung, ein neues Reinigungsverfahren für α - und omega-Interferone mit Hilfe einer neuen Antikörper-

Affinitätssäule, enthaltend die oben erwähnten neuen monoklonalen Antikörper, und Verfahren zu ihrer Herstellung, neue Hybridplasmide zur Verbesserung der Expression der omega-Interferone und neue Zwischenplasmide zur Herstellung der neuen Plasmide sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.

EP 0 236 920 A2

BN

Boehringer Ingelheim
International GmbH

Hybridinterferone, deren Verwendung als Arzneimittel und als
Zwischenprodukte zur Herstellung von Antikörpern und deren
5 Verwendung sowie Verfahren zu ihrer Herstellung

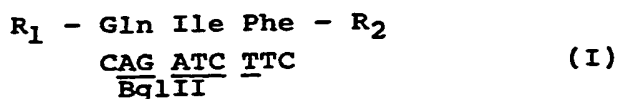
In Nucleic Acids Res. 13, 4739-4749 (1985) (siehe auch
EP-A-0.170.204) wird eine neue Klasse von Typ I Interfero-
nen beschrieben, welche als omega-Interferone bezeichnet wer-
den, die für sie kodierende DNA-Sequenzen, Plasmide, die die-
10 se DNA-Sequenzen enthalten, und die neuen Interferone produ-
zierende Organismen.

Bei der Herstellung von größeren Versuchsmengen der neuen
omega-Interferone mittels den in den oben erwähnten Publika-
tionen beschriebenen Expressionsplasmiden, z.B. mit pRHW11
15 oder pRHW12 jeweils transformiert in E. coli HB101, zeigte
es sich jedoch, daß es wünschenswert wäre, die Expression
der neuen omega-Interferone zu steigern und gleichzeitig die
erforderliche nachfolgende Reinigung der exprimierten neuen
Interferone zu verbessern.

20 Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die vorstehend
erwähnten Unzulänglichkeiten mit Hilfe von neuen Hybridin-
terferonen, bestehend aus einem Teil eines α -Interferons und
einem Teil eines omega-Interferons, sowie durch die Kon-
struktion eines neuen Plasmids, mit dem die Expression der
25 omega-Interferone verbessert werden konnte, behoben werden.

Die neuen Hybridinterferone, deren N-terminale Met- oder N-Formyl-Met-Derivate und, falls die Peptidsequenz des Hybridinterferons eine Glykosylierungsstelle enthält, deren N-glykosylierte Derivate weisen teilweise überlegene pharmakologische Eigenschaften aus, diese sind jedoch insbesondere zur Herstellung von neuen monoklonalen Antikörpern, welche zur Reinigung von α - und omega-Interferonen geeignet sind, verwendbar.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit neue BglIII-Hybridinterferone der Formel



in der BglIII die gemeinsame BglIII-Restriktionsstelle der $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und omega-Interferone, R_1 die Peptidsequenz eines $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Interferons, die durch die DNA-Sequenz dieser Interferone vor der BglIII-Schnittstelle kodiert wird, und R_2 die Peptidsequenz eines omega-Interferons, die durch die DNA-Sequenz dieses Interferons nach der BglIII-Schnittstelle kodiert wird, oder R_1 die Peptidsequenz eines omega-Interferons, die durch die DNA-Sequenz dieses Interferons vor der BglIII-Schnittstelle kodiert wird, und R_2 die Peptidsequenz eines $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Interferons, die durch die DNA-Sequenz dieser Interferone nach der BglIII-Schnittstelle kodiert wird, bedeuten, deren N-terminale Met- oder N-Formyl-Met-Derivate und, falls die Peptidsequenz des Hybridinterferons eine Glykosylierungsstelle enthält, deren N-glykosylierte Derivate, deren Verwendung als Arzneimittel und als Zwischenprodukte zur Immunisierung von Versuchstieren, die für diese Hybridinterferone kodierende DNA-Sequenzen und Verfahren zu ihrer Herstellung,

neue monoklonale Antikörper und deren Verwendung zur Reinigung von α - und omega-Interferonen, die sie sezernierende Hybridzelllinien und Verfahren zu ihrer Herstellung,

ein neues Reinigungsverfahren für α - und omega-Interferone
5 mit Hilfe einer neuen Antikörper-Affinitätssäule, die oben erwähnten neuen monoklonalen Antikörper enthaltend, und Verfahren zu ihrer Herstellung,

neue Plasmide zur Verbesserung der Expression der omega-Interferone und neue Zwischenplasmide zur Herstellung der neuen
10 Plasmide sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.

Erfindungsgemäß wird zur Herstellung der vorstehend genannten Gegenstände wie folgt verfahren:

Das erste Ziel der vorliegenden Erfindung ist, die Reinigung der omega-Interferone zu verbessern, insbesondere da es
15 bisher nicht gelang, eine entsprechende Anti-omega-Interferon-Antikörper-Affinitätssäule nach bekannten Methoden herzustellen.

Einen Ausweg aus dieser Situation stellen die neuen Hybridinterferone der vorliegenden Erfindung dar, welche aus einem
20 Teil eines α -Interferons, vorzugsweise aus einem Teil eines $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Interferons, z.B. des IFN- $\alpha 2$ (Arg) (siehe EP-A-0.095.702), und einem Teil eines omega-Interferons, vorzugsweise aus einem Teil des omegal(Glu)- oder omegal(Gly)-Interferons (siehe EP-A-0.170.204), aufgebaut sind.
25 Hierbei erfolgt beispielsweise beim IFN- $\alpha 2$ (Arg) und IFN-omegal die Verknüpfung der für die entsprechenden Teile kodierende DNA-Sequenzen über die BglII-Schnittstelle, die sich in den Positionen 191-196 in beiden Genen befindet. Hierbei muß eine gegebenenfalls vorhandene Lücke in das Peptid von
30 Aminosäure 1 bis 66 eines α -Interferons, z.B. die Lücke für die Aminosäure Nr. 45 im IFN- $\alpha 2$ (Arg), mitgezählt werden, da-

mit die Sequenz beider Gene miteinander verglichen werden können, wie aus der nachfolgenden Abbildung hervorgeht (einschließlich des N-terminalen Met-Restes, welcher nach der bakteriellen Proteinsynthese meistens wieder abgespalten wird):

	5	10	15	
	Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr			
	ATG TGT GAT CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG AGG ACC	45		
	Met Cys Asp Leu Pro Gln Asn His Gly Leu Leu Ser Arg Asn Thr			
10	ATG TGT GAT CTG CCT CAG AAC CAT GGC CTA CTT AGC AGG AAC ACC	45		
	20	15	30	
	Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys			
	TTG ATG CTC CTG GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC TGC	90		
	Leu Val Leu Leu His Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys			
15	TTG GTG CTT CTG CAC CAA ATG AGG AGA ATC TCC CCT TTC TTG TGT	90		
	35	40	45	
	Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe ...			
	TTG AAG GAC AGA CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT ...	135		
	Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Met Val Lys			
20	CTC AAG GAC AGA AGA GAC TTC AGG TTC CCC CAG GAG ATG GTA AAA	135		
	50	55	60	
	Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu			
	GGC AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG	180		
	Gly Ser Gln Leu Gln Lys Ala His Val Met Ser Val Leu His Glu			
25	GGG AGC CAG TTG CAG AAG GCC CAT GTC ATG TCT GTC CTC CAT GAG	180		
	65	70	75	
	Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser			
	ATG ATC CAG <u>CAG</u> <u>ATC</u> <u>TTC</u> AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT	225		
	Met Leu Gln Gln Ile Phe Ser Leu Phe His Thr Glu Arg Ser Ser			
30	ATG CTG CAG <u>CAG</u> <u>ATC</u> <u>TTC</u> AGC CTC TTC CAC ACA GAG CGC TCC TCT	225		

	80	85	90
	Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu		
	GCT GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA CTC	270	
	Ala Ala Trp Asn Met Thr Leu Leu Asp Gln Leu His Thr Gly Leu		
5	GCT GCC TGG AAC ATG ACC CTC CTA GAC CAA CTC CAC ACT GGA CTT	270	
	95	100	105
	Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val		
	TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA CAG GGG GTG	315	
	His Gln Gln Leu Gln His Leu Glu Thr Cys Leu Leu Gln Val Val		
10	CAT CAG CAA CTG CAA CAC CTG GAG ACC TGC TTG CTG CAG GTA GTG	315	
	110	115	120
	Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala		
	GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG GCT	360	
	Gly Glu Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ile Ser Ser Pro Ala Leu Thr		
15	GGA GAA GGA GAA TCT GCT GGG GCA ATT AGC AGC CCT GCA CTG ACC	360	
	125	130	135
	Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys		
	GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA GAG AAG	405	
	Leu Arg Arg Tyr Phe Gln Gly Ile Arg Val Tyr Leu Lys Glu Lys		
20	TTG AGG AGG TAC TTC CAG GGA ATC CGT GTC TAC CTG AAA GAG AAG	405	
	140	145	150
	Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met		
	AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG	450	
	Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Met Glu Ile Met		
25	AAA TAC AGC GAC TGT GCC TGG GAA GTT GTC AGA ATG GAA ATC ATG	450	
	155	160	165
	Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser		
	<u>AGA</u> <u>TCT</u> <u>TTT</u> TCT TTG TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT	495	
	Lys Ser Leu Phe Leu Ser Thr Asn Met Gln Glu Arg Leu Arg Ser		
30	AAA TCC TTG TTC TTA TCA ACA AAC ATG CAA GAA AGA CTG AGA AGT	495	

170

Lys Glu	504
AAG GAA TGA	
Lys Asp Arg Asp Leu Gly Ser Ser	522
AAA GAT AGA GAC CTG GGC TCA TCT TGA	

5 In der obigen Abbildung stellt in jeder Doppelreihe die erste Reihe die entsprechenden Sequenzen des IFN- α 2(Arg) und die zweite Reihe die des omegal-Interferons dar, hierbei befindet sich in den Nukleotidpositionen 191-196 die gemeinsame BglIII-Schnittstelle für beide Gene - das IFN- α 2(Arg)-Gen
10 weist an der Nukleotidposition 451-456 eine zweite BglIII-Schnittstelle auf.

Ferner enthalten die nachfolgenden nicht maßstabgerechten Darstellungen der einzelnen Plasmide nur die wesentlichen Sequenzen und Restriktionsenzymkennungsstellen. Hierbei
15 wurden folgende Abkürzungen benutzt:

Restriktionsenzymkennungssequenzen:

B: BamHI, Bg: BglII, Bgl: 1.BglII-Stelle im IFN- α 2(Arg)-Gen,
Bg2: 2.BglII-Stelle im IFN- α 2(Arg)-Gen,
E: EcoRI, H: HindIII, N: NcoI, P: PstI, S: SphI

20 p/o: Tryptophan Promotor/Operator (*Serratia marcescens*) mit anschließender Shine-Dalgarno Sequenz (ribosomale Bindungsstelle)

par: partition Lokus aus dem Plasmid pPM31

ori: Replikationsursprung

25 Ap^r: Ampicillin Resistenzgen

Tc^r: Tetracyclin Resistenzgen

Tc^S: Tetracyclin sensitiv

kb: 1000 Basenpaare

Desweiteren sind in der vorliegenden Anmeldung folgende Figuren enthalten:

5 Fig. 1: Konstruktionsschema für parpATER33

Fig. 2: Konstruktionsschema für pRHW14

Fig. 3: Autoradiogramm von ³⁵S markierten Proteinen aus Maxizellen (E.coli CSR 603)

Fig. 4: Konstruktionsschema für pRH72

10 Fig. 5: Konstruktionsschema für pRH78r und pRH78f

Fig. 6: MONO-S Chromatogramm von IFN-omegal/ α 2(BglIII)
AUFS = Absorption units full scale

Fig. 7: Gelpermeations-HPLC von IFN-omegal/ α 2(BglIII)

Fig. 8: MONO-S Chromatogramm von IFN-omegal

15 Fig. 9: Reverse Phase-HPLC von IFN-omegal

Die neuen BglIII-Hybridinterferone und deren N-glykosylierte Derivate bestehen also entweder aus den Aminosäuren 1-66 eines α 1- oder α 2-Interferons, vorzugsweise aus den Aminosäuren 1-65 des IFN- α 2(Arg), und den Aminosäuren 67 bis 173

20 eines omegal-Interferons oder aus den Aminosäuren 1 bis 66 des omegal-Interferons und den Aminosäuren 67 bis 167 eines α 1- oder α 2-Interferons, vorzugsweise aus den Aminosäuren 66 bis 166 des IFN- α 2(Arg), wobei der N-terminale Met-Rest nach der bakteriellen Proteinsynthese meistens wieder abgespalten
25 wird.

Überraschenderweise werden die neuen Hybridinterferone von Anti-IFN- α -Antikörpern erkannt. Dadurch wird die Reinigung der neuen Hybridinterferone mittels literaturbekannter Anti-IFN- α -Antikörpern (siehe beispielsweise EP-A-0.119.476) 5 möglich. Mit einem so erhaltenen reinen neuen Hybridinterferon kann dann durch Immunisierung eines Versuchstieres wie BALB/c-Mäusen die Bildung des entsprechenden Antikörpers induziert werden. Diese neuen Antikörper erkennen nicht nur die neuen Hybridinterferone, sondern überraschenderweise 10 auch die einzelnen Bausteine der Hybridinterferone, z.B. ein omega-Interferon.

Die Ausgangsbasis zur Konstruktion der entsprechenden Hybridinterferon-Plasmide ist somit die gemeinsame BglII-Restriktionsstelle in den Positionen 191-196 eines $\alpha 1$ -, 15 $\alpha 2$ - und omegal-Interferongens, wie dies bereits vorstehend erwähnt wurde, wobei die Lücke für das Codon Nr. 45 im IFN- $\alpha 2$ (Arg)-Gen mitgezählt wurde, sowie zur Isolierung des entsprechenden, erforderlichen Gens die für ein $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -Interferon bzw. für ein omegal-Interferon kodierenden 20 Plasmide.

Hierzu wird nun zuerst erfindungsgemäß ein die omegal-Interferon-Expression verbesserndes neues Plasmid hergestellt. Hierbei dient als Ausgangsplasmid das literaturbekannte und käuflich erhältliche Plasmid pAT153 (Fa. Amersham, siehe 25 auch A.J. Twigg et al. in Nature 283, 216-218 (1980)), beispielsweise das für IFN- $\alpha 2$ (Arg) kodierende Plasmid parPER33 (siehe EP-A-0.115.613) und ein für ein omegal-Interferon der Formel

					5					10					15
30	Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Asn	His	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Asn	Thr	Leu
					20					25					30
	Val	Leu	Leu	His	Gln	Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Pro	Phe	Leu	Cys	Leu

		35		40		45
	Lys	Asp	Arg	Arg	Asp	Phe
					Arg	Phe
					Pro	Gln
					Glu	Met
					Val	Lys
					Gly	
		50		55		60
	Ser	Gln	Leu	Gln	Lys	Ala
					His	Val
					Met	Ser
					Val	Leu
					His	Glu
					Met	
5		65		70		75
	Leu	Gln	Gln	Ile	Phe	Ser
					Leu	Phe
					His	Thr
					Glu	Arg
					Ser	Ser
					Ala	
		80		85		90
	Ala	Trp	Asn	Met	Thr	Leu
					Leu	Leu
					Asp	Gln
					Leu	His
					Thr	Gly
					Leu	His
		95		100		105
10	Gln	Gln	Leu	Gln	His	Leu
					Glu	Thr
					Cys	Leu
					Leu	Leu
					Gln	Val
					Val	Gly
		110		115		120
	Glu	Gly	Glu	Ser	Ala	-X-
					Ala	Ile
					Ser	Ser
					Pro	Ala
					Leu	Thr
					Leu	
		125		130		135
	Arg	Arg	Tyr	Phe	Gln	Gly
					Ile	Arg
					Val	Tyr
					Leu	Lys
					Glu	Lys
					Lys	
15		140		145		150
	Tyr	Ser	Asp	Cys	Ala	Trp
					Glu	Val
					Val	Arg
					Met	Glu
					Ile	Met
					Lys	
		155		160		165
	Ser	Leu	Phe	Leu	Ser	Thr
					Asn	Met
					Gln	Glu
					Arg	Leu
					Arg	Ser
					Lys	
		170				
20	Asp	Arg	Asp	Leu	Gly	Ser
					Ser	

in der

X in Position 111 für Glu oder Gly steht,

kodierendes Plasmid wie das Plasmid pRHW11 oder 12 (siehe EP-A-0.170.204):

25 Das Plasmid parpER33, welches den par-Lokus mit der Sequenz der Formel

	GAATTCCGAC	AGTAAGACGG	GTAAGCCTGT	TGATGATACC	GCTGCCTTAC	50
	TGGGTGCATT	AGCCAGTCTG	AATGACCTGT	CACGGGATAA	TCCGAAGTGG	100
	TCAGACTGGA	AAATCAGAGG	GCAGGAACTG	CTGAACAGCA	AAAAGTCAGA	150
30	TAGCACCACA	TAGCAGACCC	GCCATAAAAC	GCCCTGAGAA	<u>Z</u> CCGTGACGG	200
	GCTTTTCTTG	TATTATGGGT	AGTTTCCTTG	CATGAATCCA	TAAAAGGCGC	250
	CTGTAGTGCC	ATTTACCCCC	ATTCAGTGCC	AGAGCCGTGA	GCGCAGCGAA	300
	CTGAATGTCA	CGAAAAAGAC	AWCGACTCAG	GTGCCTGATG	GTCGGAGACA	350
	AAAGGAATAT	TCAGCGATTT	GCCCCGAGGAA	TTC		383

in der

Z das Nukleotid G oder C und

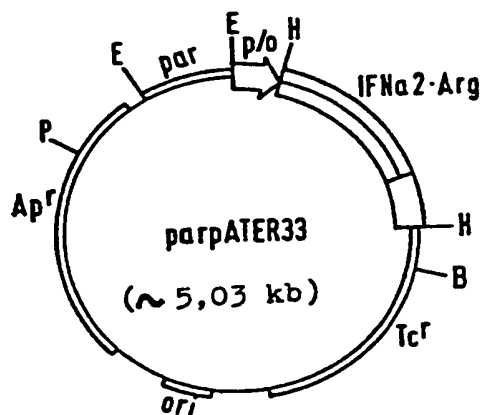
W das Nukleotid G oder kein Nukleotid bedeuten, sowie die für die Expression erforderlichen Replikon- und Kontrollse-

5 quenzen des Plasmids pER103 (siehe Anspruch 7) enthält, wird mit BamHI und PstI geschnitten. Die dabei entstehenden beiden Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese, z.B. mit 1%igem Agarosegel, aufgetrennt und das kleinere Fragment, welches das IFN- α 2(Arg)-Gen enthält, wurde mittels Elektroelution
10 isoliert. Die so erhaltene DNA wurde anschließend durch Zusatz von Äthanol ausgefällt, abzentrifugiert und in einem geeigneten Puffer wie TE-Puffer, z.B. in 10 mMol Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), pH=8,0, und 1 mMol Äthylen-dinitrilotetraessigsäure-dinatriumsalz (EDTA)) aufgenommen.

15 Das Plasmid pAT153 wird ebenfalls mit BamHI und PstI geschnitten. Die dabei entstehenden beiden Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese, z.B. mit 1%igem Agarosegel, aufgetrennt, und das größere Fragment, welches den Replikationsursprung enthält, isoliert. Das so erhaltene größere
20 Fragment wird anschließend mit dem aus dem Plasmid parpER33 erhaltenen kleineren Fragment in Gegenwart einer Ligase, z.B. T₄ DNA-Ligase, ligiert. Zur Replikation der entstehenden Plasmide werden Bakterien, vorzugsweise E.coli vom Stamm HB101 (Genotyp F⁻, hsdS20(r⁻, m⁻), recA13,
25 ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Sm^r), xyl-5, mtl-1, supE44, lambda⁻), mit einer CaCl₂-Lösung gewaschen, und die so erhaltenen, kompetenten E.coli HB 101 mit der Ligasereaktionsmischung vermischt, und nach Inkubation bei 0°C wird die Plasmid-DNA durch Hitzeschock bei 42°C für 2
30 Minuten von den Bakterien aufgenommen. Anschließend werden die transformierten Bakterien auf Ampicillin-haltigen LB-Agar (LB-Medium + 15 g/l Agar) plattiert. Auf diesem Agar können nur E. coli HB101-Bakterien wachsen, die ein rekombinantes Vektormolekül aufgenommen haben. Nach Inkubation bei
35 37°C wurden 12 der entstandenen Kolonien ausgewählt und von

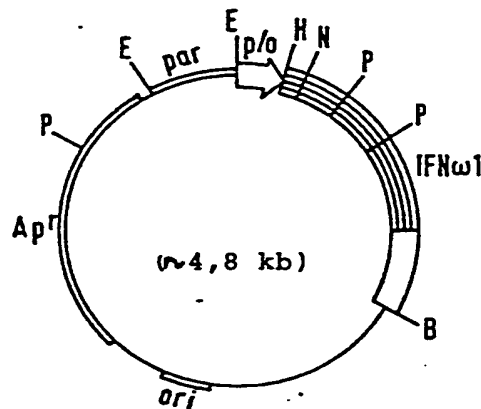
diesen nach der Methode von Birnboim et al. (siehe Nucl. Acids Res. 7, 1513 (1979)) die Plasmide isoliert. Durch Restriktionsenzymdoppelverdauung der ausgewählten Plasmide mit PstI-BamHI, PstI-PvuII oder EcoRI-BamHI und anschließen-
 5 der Gelelektrophorese der erhaltenen Fragmente wurde die Richtigkeit der Konstruktion dieser Plasmide bestätigt. Ein so erhaltenes Plasmid wurde ausgewählt und mit parpATER33 (Konstruktionsschema: siehe Figur 1) bezeichnet. Dieses Plasmid zeigt transformiert in *E. coli* HB101 den Phänotyp
 10 Ap^r (Ampicillin-Resistenz), Tc^r (Tetracyclin-Resistenz).

Das so erhaltene Plasmid parpATER33 mit der Restriktionskarte



wird zur Herstellung eines die Expression von omegal-Interferon verbessernden Plasmids (Konstruktionsschema: siehe Figur 2) mit HindIII und BamHI geschnitten. Die dabei entstehenden drei Fragmente werden mittels Gelelektrophorese, z.B.
 15 mit 1%igem Agarosegel, aufgetrennt und das größte, ca. 3750 Basenpaare (bp) lange Fragment (Fragment a), welches den Tryptophan-Promotor/Operator (*Serratia marcescens*), den Replikationsursprung und das Ap^r -Gen trägt, isoliert und
 20 mit der für ein omegal-Interferon kodierenden DNA ligiert. Diese DNA erhält man durch Schneiden eines für omegal-Interferon kodierenden Plasmid, vorzugsweise durch Schneiden des Plasmids pRHW11 bzw. pRHW12 mit BamHI und HindIII und an-

schließendem Auftrennen der beiden so erhaltenen Fragmente mittels Gelelektrophorese, wobei das gewünschte Gen in dem kleineren, ca. 800 bp langen Fragment enthalten ist. Zur Replikation der entstandenen Plasmide werden Bakterien, vorzugsweise *E. coli* HB101, mit einer CaCl_2 -Lösung gewaschen und die so erhaltenen, kompetenten *E. coli* HB101 mit der Ligasereaktionsmischung vermischt, und nach Inkubation bei 0°C wird die Plasmid-DNA durch Hitzeschock bei 42°C für 2 Minuten von den Bakterien aufgenommen. Anschließend werden die transformierten Bakterien auf Ampicillin-haltigen LB-Agar plattiert. Auf diesem Agar können nur *E. coli* HB101-Bakterien wachsen, die ein rekombinantes Vektormolekül aufgenommen haben. Nach Inkubation bei 37°C werden 6 der entstandenen Kolonien ausgewählt, und von diesen nach der Methode von Birnboim et al. (siehe Nucl. Acids Res. 7, 1513 (1979)) die Plasmide isoliert. Durch Restriktionsenzymverdauung der ausgewählten Plasmide mit *EcoRI*, *HindIII*, *NcoI* und *PstI* und anschließender Gelelektrophorese wurde die Richtigkeit der Konstruktion dieser Plasmide bestätigt. Ein so erhaltenes Plasmid mit der Restriktionskarte



, wobei IFN ω 1 die für IFN-omegal(Gly) oder IFN-omegal(Glu) kodierende DNA-Sequenz darstellt, wurde ausgewählt, und mit pRHW14 (siehe Figur 2) bezeichnet, wenn als Ausgangsplasmid das Plasmid pRHW12, welches für omegal(Gly)-Interferon ko-

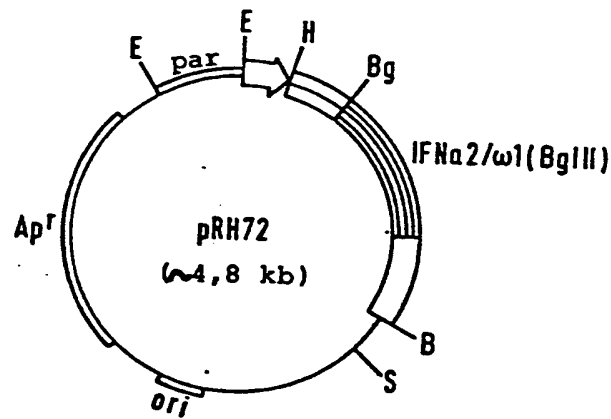
diert, verwendet wird. Dieses Plasmid zeigt transformiert in E. coli HB101 den Phänotyp Ap^r und Tc^s.

Bei Verwendung von pRHW11 als Ausgangsplasmid erhält man analog das Plasmid pRHW13, welches für omegal(Glu)-Interferon kodiert.

- Das so erhaltene Plasmid pRHW14 weist eine doppelt so große Expressionsrate für das omegal(Gly)-Interferon auf als das bisher bekannte Plasmid pRHW12 (siehe EP-A-0.170.204) wie im Maxizell-System (siehe J. Bacteriol. 137, 692-693 (1979))
- 10 nachgewiesen werden kann. Hierzu wird E. coli CSR603 (Genotyp F⁻, thr-1, leuB6, proA2, phr-1, recA1, argE3, thi-1, uvrA6, ara-14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, gyrA98 (nalA98), rpsL31, tsx-33, lambda⁻, supE44), welcher defizient im Reparatursystem für UV-induzierte Schäden ist, mit den Plasmiden
- 15 pRHW12 und pRHW14 transformiert. Wird die Strahlendosis so gewählt, daß zwar das Bakterienchromosom oft, die Plasmide aber kaum geschädigt werden, so erfolgt Transkription und in der Folge Translation vorwiegend nur von Plasmid-kodierten Genen. Enthält das Medium ³⁵S-Methionin, so werden
- 20 hauptsächlich Plasmid-Genprodukte markiert, die nach Auftrennen auf einem Acrylamidgel unter Verwendung einer Verstärkerfolie direkt mit Hilfe eines Röntgenfilms registriert werden können (siehe Figur 3). Das Ampicillin-Resistenzgenprodukt (β-Lactamase, bla) wird in beiden Fällen gleich
- 25 stark markiert. Im Falle des pRHW14 ist jedoch das omegal(Gly)-Interferon doppelt so stark markiert wie beim pRHW12.

- Zur Herstellung eines für ein Hybridinterferon der Formel I kodierenden Plasmids, das vor der gemeinsamen BglII-Schnitt-
- 30 stelle die für α1- oder α2-Interferon kodierende DNA-Sequenzen enthält (Konstruktionsschema: siehe Figur 4), wird beispielsweise das Plasmid parpATER33 und ein für ein omegal-

- Interferon kodierendes Plasmid wie das Plasmid pRHW14 jeweils mit BglII und SphI geschnitten. Die hierbei entstandenen Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese, z.B. mit 1%igem Agarosegel, aufgetrennt, eluiert und mittels Äthanol-Präzipitation gereinigt. Nach Lösen der Fragmente in einem geeigneten Puffer, z.B. in TE-Puffer, wurde das aus dem Plasmid parpATER33 erhaltene, große Fragment mit dem aus dem Plasmid pRHW14 erhaltenen, kleineren Fragment in Gegenwart einer Ligase, z.B. T₄ DNA-Ligase, ligiert. Zur Replikation der entstandenen Plasmide wurden Bakterien, vorzugsweise E.coli vom Stamm HB101 (Genotyp F⁻, hsdS20(r⁻, m⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Sm^r), xyl-5, mtl-1, supE44, lambda⁻), mit einer CaCl₂-Lösung gewaschen, und die so erhaltenen kompetenten E.coli HB 101 mit der Ligasereaktionsmischung vermischt, und nach Inkubation bei 0°C wird die Plasmid-DNA durch Hitzeschock bei 42°C für 2 Minuten von den Bakterien aufgenommen. Anschließend werden die transformierten Bakterien auf Ampicillin-haltigen LB-Agar (LB-Medium + 15 g/l Agar) plattiert. Auf diesem Agar können nur E. coli HB101-Bakterien wachsen, die ein rekombinantes Vektormolekül aufgenommen haben. Nach Inkubation bei 37°C wurden mehrere der entstandenen Kolonien ausgewählt und von diesen nach der Methode von Birnboim et al. (siehe Nucl. Acids Res. 7, 1513 (1979)) die Plasmide isoliert.
- 25 Durch Restriktionsenzymdoppelverdauung der ausgewählten Plasmide mit BglII und SphI und anschließender Gelelektrophorese der erhaltenen Fragmente wurde die Richtigkeit der Konstruktion dieser Plasmide bestätigt. Ein so erhaltenes Plasmid wurde ausgewählt und mit pRH72 bezeichnet. Dieses
- 30 Plasmid mit der Restriktionskarte



zeigt transformiert in *E. coli* HB101 den Phänotyp Ap^r und Tc^s und kodiert für das IFN- $\alpha 2/\omega 1$ (Gly)(BglIII) der Formel

	5	10	15
5	Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu		
	20	25	30
	Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu		
	35	40	45
	Lys Asp Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn		
10	50	55	60
	Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile		
	65	70	75
	Gln Gln Ile Phe Ser Leu Phe His Thr Glu Arg Ser Ser Ala Ala		
	80	85	90
15	Trp Asn Met Thr Leu Leu Asp Gln Leu His Thr Gly Leu His Gln		
	95	100	105
	Gln Leu Gln His Leu Glu Thr Cys Leu Leu Gln Val Val Gly Glu		
	110	115	120
	Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ile Ser Ser Pro Ala Leu Thr Leu Arg		
20	125	130	135
	Arg Tyr Phe Gln Gly Ile Arg Val Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr		
	140	145	150
	Ser Asp Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Met Glu Ile Met Lys Ser		

155 160 165
 Leu Phe Leu Ser Thr Asn Met Gln Glu Arg Leu Arg Ser Lys Asp
 170
 Arg Asp Leu Gly Ser Ser

5 , dessen Met- und N-Formyl-Met-Derivat sowie dessen N-glykosyliertes Derivat, und enthält die für dieses Peptid kodierende Sequenz der Formel

ATG TGT GAT CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG AGG ACC 45
 TTG ATG CTC CTG GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC TGC 90
 10 TTG AAG GAC AGA CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GGC 135
 AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG ATG 180
 ATC CAG CAG ATC TTC AGC CTC TTC CAC ACA GAG CGC TCC TCT GCT 225
 GCC TGG AAC ATG ACC CTC CTA GAC CAA CTC CAC ACT GGA CTT CAT 270
 CAG CAA CTG CAA CAC CTG GAG ACC TGC TTG CTG CAG GTA GTG GGA 315
 15 GAA GGA GAA TCT GCT GGG GCA ATT AGC AGC CCT GCA CTG ACC TTG 360
 AGG AGG TAC TTC CAG GGA ATC CGT GTC TAC CTG AAA GAG AAG AAA 405
 TAC AGC GAC TGT GCC TGG GAA GTT GTC AGA ATG GAA ATC ATG AAA 450
 TCC TTG TTC TTA TCA ACA AAC ATG CAA GAA AGA CTG AGA AGT AAA 495
 GAT AGA GAC CTG GGC TCA TCT TGA 519

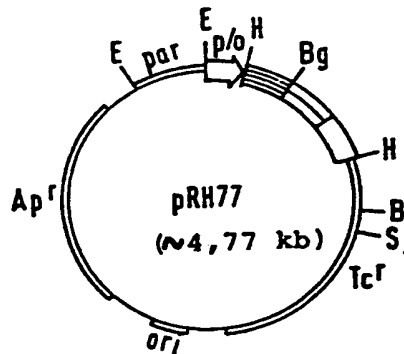
20 oder deren degenerierte Varianten.

Zur Herstellung eines für ein Hybridinterferon der Formel I kodierenden Plasmids, das vor der gemeinsamen BglII-Schnittstelle die für ein omega-Interferon kodierende DNA-Sequenz enthält (Konstruktionsschema: siehe Figur 5), muß, falls in
 25 der DNA-Sequenz des α -Interferons zwei BglII-Schnittstellen wie in der DNA-Sequenz des IFN- α 2(Arg) vorhanden sind, in zwei Schritten verfahren werden:

Im ersten Schritt wird das aus dem Plasmid pRHW14 durch Schnitt mit BglII und SphI gewonnene große Fragment mit dem
 30 aus dem Plasmid parpATER33 durch Verdauen mit BglII und SphI

gewonnene Fragment, welches den C-Terminus des IFN- α 2(Arg) kodiert, in Gegenwart einer Ligase, z.B. T₄ DNA-Ligase, ligiert. Zur Replikation der entstandenen Plasmide wurden Bakterien, vorzugsweise E. coli HB 101, wie vorstehend bei 5 der Herstellung des Plasmids pRH72 beschrieben, transformiert, kultiviert und auf ihre Konstruktion hin überprüft.

Ein so erhaltenes Plasmid wurde ausgewählt und mit pRH77 bezeichnet, dieses weist folgende Restriktionskarte auf:

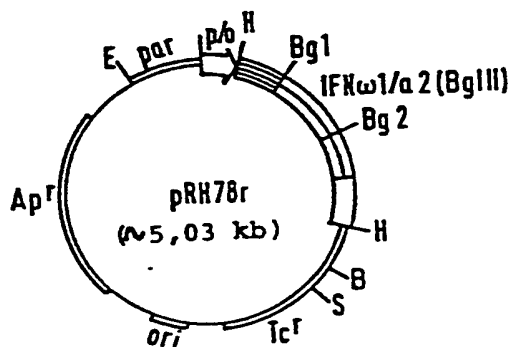


Im 2. Schritt muß nunmehr, um das Gen für das Hybridinterferon, z.B. des IFN-omegal/ α 2(BglII), zu komplettieren, das beim Schneiden von parpATER33 entfernte Fragment mit den Positionen 192-455 wieder in das Plasmid pRH77 eingebracht werden. Hierzu wird das Plasmid pRH77 mit BglII geschnitten, und das 5'-terminale Phosphat mit Kalbsdarm-Phosphatase 15 (CIP) entfernt. Die so erhaltene linearisierte Form des Plasmids pRH77 wurde durch Gelelektrophorese, z.B. mit einem 1%igen Agarosegel, aufgetrennt, isoliert und mittels Äthanol-Präzipitation gereinigt. Nach Lösen des so erhaltenen linearisierten Fragments in einem geeigneten Puffer, 20 z.B. in TE-Puffer, wurde dieses mit dem beim ursprünglichen Verdauen von parpATER33 mit BglII und SphI erhaltenen 263 bp langen Fragment in Gegenwart einer Ligase, z.B. T₄ DNA-Ligase, ligiert. Zur Replikation der entstandenen Plasmide werden Bakterien, vorzugsweise E. coli HB101, wie vorstehend

bei der Herstellung des Plasmids pRH72 beschrieben, transformiert, kultiviert und auf ihre Konstruktion hin durch Schnitt mit den Restriktionsendonucleasen AluI oder HaeIII auf ihre Richtigkeit hin untersucht. Die Insertion des 263 5 pb langen Fragments erfolgt hierbei auf Grund der identischen Enden in zwei Orientierungen.

Das Plasmid, in dem das 263 bp lange BglIII-Fragment in der für die Expression richtigen Lage insertiert wurde, wurde mit pRH78r, und jenes mit der für die Expression falschen 10 Orientierung mit pRH78f bezeichnet.

Beide Plasmide zeigen transformiert in E. coli HB101 den Phänotyp Ap^r und Tc^r. Das Plasmid pRH78r mit der Restriktionskarte



kodiert folgende Polypeptidesequenz für das 15 IFN-omegal/α2(BglIII) und enthält die für dieses Peptid kodierende Sequenz:

	5	10	15	
	Met Cys Asp Leu Pro Gln Asn His Gly Leu Leu Ser Arg Asn Thr			
	ATG TGT GAT CTG CCT CAG AAC CAT GGC CTA CTT AGC AGG AAC ACC	45		
20	20	25	30	
	Leu Val Leu Leu His Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys			
	TTG GTG CTT CTG CAC CAA ATG AGG AGA ATC TCC CCT TTC TTG TGT	90		

		35		40		45	
		Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Met Val Lys					
		CTC AAG GAC AGA AGA GAC TTC AGG TTC CCC CAG GAG ATG GTA AAA	135				
		50		55		60	
5	Gly Ser Gln Leu Gln Lys Ala His Val Met Ser Val Leu His Glu						
	GGG AGC CAG TTG CAG AAG GCC CAT GTC ATG TCT GTC CTC CAT GAG	180					
		65		70		75	
	Met Leu Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser						
	ATG CTG CAG <u>CAG</u> <u>ATC</u> <u>TTC</u> AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT	225					
10		80		85		90	
	Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu						
	GCT GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA CTC	270					
		95		100		105	
	Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val						
15	TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA CAG GGG GTG	315					
		110		115		120	
	Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala						
	GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG GCT	360					
		125		130		135	
20	Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys						
	GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA GAG AAG	405					
		140		145		150	
	Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met						
	AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG	450					
25		155		160		165	
	Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser						
	<u>AGA</u> <u>TCT</u> TTT TCT TTG TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT	495					
	Lys Glu						
	AAG GAA TGA						

[illegible]

Zur Replikation bzw. zur Expression können die neuen Plasmide der vorliegenden Erfindung in einen bakteriellen Wirt eingebracht werden. Hierbei haben sich Prokaryoten wie *E. coli* K12, Stamm 294 (ATCC Nr. 31.446), *E. coli* X1776 (ATCC Nr. 31.537), *E. coli* W3110 (F^- , λ^- , Prototroph, ATCC Nr. 27.325), *E. coli* HB101 ((F^-) , $hsdS20(r^-, m^-)$, $recA13$, $ara-14$, $proA2$, $lacY1$, $galK2$, $rpsL20(Smr)$, $xyl-5$, $mtl-1$, $supE44$, λ^-), Bazillen wie *Bacillus subtilis*, und andere Enterobacteriaceae, wie *Salmonella typhimurium* oder *Serratia marcescens* und verschiedene Pseudomonaden als geeignet erwiesen.

Zur Expression der neuen Hybridinterferone wurde beispielsweise das Plasmid pRH72, pRH78f und pRH78r jeweils in *E. coli* transformiert und kultiviert. Die antivirale Aktivität der exprimierten Polypeptide wurde im Zellüberstand nach der Zerstörung der Zellwände und Abzentrifugation der Bakterientrümmer und mittels des CPE-Reduktionstest bestimmt. Hierbei zeigte sich, daß die aus *E. coli* transformiert mit pRH72 und *E. coli* transformiert mit pRH78f gewonnenen Zellüberstände keine antiviralen Eigenschaften aufweisen. Überraschenderweise weist jedoch der aus dem Plasmid pRH78r gewonnene Zellüberstand, der das IFN- ω gal/ $\alpha 2$ (Bg1II) enthält, eine etwa viermal höhere spezifische antivirale Aktivität auf A549-Zellen als IFN- $\alpha 2$ (Arg) auf.

Wie für ein neuen Hybridinterferon kodierenden DNA-Sequenzen der neuen erfindungsgemäß hergestellten Plasmide können desweiteren nach entsprechender Veränderung in jeden anderen Organismus eingebracht werden.

Hierbei kann die Expression und Translation einer derartigen Sequenz auch unter Kontrolle anderer Regulationssysteme, die als "homolog" zu dem Organismus in seiner untransformierten Form gelten können, ablaufen. So enthält z.B. chromosomale DNA von einem Lactose-abhängigen *E. coli* ein Lactose oder

Lac-Operon, das durch Ausschüttung des Enzyms Beta-Galactosidase den Lactose-Abbau ermöglicht.

Die Lac-Kontrollelemente können aus dem Bacteriophagen Lambda-plac5, der infektiös für E. coli ist, erhalten werden. Das
Lac-Operon des Phagen kann durch Transduktion aus derselben
Bakterien-Spezies stammen. Regulationssysteme, die bei dem
erfindungsgemäßen Verfahren Verwendung finden können, können
auch aus plasmidischer DNA stammen, die dem Organismus eigen
ist. Das Lac-Promotor-Operator-System kann durch IPTG (Iso-
propylthiogalactosid) induziert werden.

Andere Promotor-Operator-Systeme oder Teile hiervon können
genauso gut verwendet werden: beispielsweise Arabinose-Promo-
tor/Operator, Colicin E₁-Promotor/Operator, Galactose-
Promotor/Operator, alkalischer Phosphatase-Promotor/Opera-
tor, trp-Promotor/Operator, Xylose-A-Promotor/Operator,
tacPromotor u.ä..

Zusätzlich zu Prokaryoten können auch Eukaryoten, wie Hefe
verwendet werden. Saccharomyces cerevisiae ist die am mei-
sten verwendete unter den eukaryotischen Mikroorganismen,
obwohl eine Anzahl anderer Spezies allgemein erhältlich ist.
Zur Expression in Saccharomyces wird beispielsweise das
Plasmid YRp7 (Stinchcomb et al. Natur 282, 39 (1979);
Kingsman et al., Gene 7, 141 (1979); Tschumper et al., Gene
10, 157 (1980)) und das Plasmid YEp 13 (Bwach et al., Gene
8, 121-133 (1979)) üblicherweise verwendet. Das Plasmid YRp7
enthält das TRP1-Gen, das einen Selektionsmarker für eine
Hefemutante bereitstellt, die unfähig ist, in tryptophan-
losem Medium zu wachsen; beispielsweise ATCC Nr. 44076.

Das Vorhandensein des TRP1-Schadens als Charakteristikum des
Hefe-Wirtsgenoms stellt dann ein wirksames Hilfsmittel dar,

um die Transformation nachzuweisen, indem ohne Tryptophan kultiviert wird. Ganz ähnlich verhält es sich bei dem Plasmid YEpl3, das das Hefe-Gen LEU 2, das zur Ergänzung einer LEU-2-minus-Mutante verwendet werden kann, enthält. Geeignete Promotor-Sequenzen für Hefe Vektoren beinhalten die 5'-flankierende Region der Gene des ADH I (Ammerer G., Methods of Enzymology 101, 192-201 (1983)), 3-Phosphoglycerate-Kinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255, 2073 (1980)) oder andere glykolytische Enzyme (Kawaski und Fraenkel, BBRC 108, 1107-1112 (1982)) wie Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase, Pyruvat-Decarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-Phosphat-Isomerase, Phosphoglucose-Isomerase und -Glucokinase. Bei der Konstruktion geeigneter Expressionsplasmide können die mit diesen Genen assoziierten Terminationssequenzen ebenfalls in den Expressions-Vektor am 3'-Ende der zu exprimierenden Sequenz eingesetzt werden, um Polyadenylierung und Termination der mRNA vorzusehen.

Andere Promotoren, die zudem noch den Vorteil der durch Wachstumsbedingungen kontrollierten Transkription besitzen, sind die Promotor-Regionen der Gene für Alkohol-Dehydrogenase-2, Isocytochrom C, Saure-Phosphatase, abbauende Enzyme, die mit dem Stickstoff-Metabolismus gekoppelt sind, die oben erwähnte Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Enzyme, die für die Verarbeitung von Maltose und Galaktose verantwortlich sind. Promotoren, die durch den Hefe Mating Typ Locus reguliert werden, beispielsweise Promotoren der Gene BARI, MF α 1, STE2, STE3, STE5 können bei temperaturregulierten Systemen durch die Verwendung von temperaturabhängigen sil Mutationen eingesetzt werden. (Rhine PH.D. in Thesis, University of Oregon, Eugene, Oregon (1979), Herskowitz and Oshima, The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, part I, 181-209 (1981), Cold Spring Harbor Laboratory). Diese Mutationen beeinflussen die Expression der ruhenden

Mating Typ Kassetten von Hefen und dadurch indirekt die Mating Typ abhängigen Promotoren. Generell ist jedoch jeder Vektor geeignet, der einen Hefe-kompatiblen Promotor, sowie Hefe spezifische Replikations- und Terminationssequenzen
5 enthält.

Zusätzlich zu Mikroorganismen sind Kulturen multizellulärer Organismen ebenfalls geeignete Wirtsorganismen. Im Prinzip ist jede dieser Kulturen einsetzbar, ob von Wirbeltier- oder wirbellosen Zellkulturen. Größtes Interesse besteht jedoch
10 an Wirbeltier-Zellen, so daß die Vermehrung von Wirbeltierzellen in Kultur (Gewebe-Kultur) in den letzten Jahren zu einer routinemäßigen Methode wurde (Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, Editors (1973)). Beispiele solcher nützlichen Wirtszelllinien sind VERO- und HeLa-Zellen,
15 Goldhamster-Eierstock (CHO)-Zellen und W138, BHK, COS-7 und MDCK-Zelllinien. Expressionsvektoren für diese Zellen enthalten üblicherweise einen Replikationsursprung, einen Promotor, der vor dem zu exprimierenden Gen lokalisiert ist, gemeinsam mit der notwendigen RNA-Splicing-Stelle, Polyadenylierungsstelle und transkriptionelle Terminations-
20 Sequenzen.

Bei der Verwendung in Säugetierzellen werden die Kontrollfunktionen auf den Expressions-Vektoren oftmals aus viralem Material verwendet. Beispielsweise stammen die üblicherweise
25 verwendeten Promotoren aus Polyoma Adenovirus 2, und besonders häufig aus Simian Virus 40 (SV 40). Die Promotoren der frühen und späten Gene des SV 40 sind besonders nützlich, da beide leicht aus dem Virus als Fragment zu erhalten sind, das auch noch den viralen Replikationsursprung des SV 40
30 enthält. (Fiers et al., Nature 273, 113 (1978)). Auch können kleinere oder größere Fragmente des SV 40 verwendet werden, vorausgesetzt, sie enthalten die annähernd 250 bp lange Sequenz, die von der HindIII Schnittstelle bis zur Bgl I

Schnittstelle in der viralen Replikationsstelle reicht. Außerdem ist es ebenfalls möglich und oft empfehlenswert, Promotor- oder Kontroll-Sequenzen zu verwenden, die normalerweise mit den gewünschten Gensequenzen verknüpft sind, 5 vorausgesetzt, diese Kontroll-Sequenzen sind kompatibel zu den Wirtszellsystemen.

Eine Replikationsstelle kann entweder durch entsprechende Vektorkonstruktion vorgesehen werden, um eine exogene Stelle einzubauen, beispielsweise aus SV 40 oder anderen viralen 10 Quellen (z.B. Polyoma, Adeno, VSV, PBV, etc.) oder kann durch die chromosomalen Replikationsmechanismen der Wirtszelle vorgesehen werden. Wird der Vektor in das Wirtszellenchromosom integriert, reicht die zuletztgenannte Maßnahme meistens aus.

15 Basierend auf ihrem biologischen Wirkungsspektrum sind die neuen, erfindungsgemäßen Hybride, insbesondere das IFN-omegal/ α 2(BglII) Interferon verwendbar für jede Art der Behandlung, für die auch die bekannten Interferone eingesetzt werden. Diese beinhalten beispielsweise Herpesvirus, Rhino- 20 virus, virale Infektionen bei AIDS sowie andere virale Erkrankungen, verschiedene Krebsarten und Ähnliches. Die neuen Interferone können alleine oder in Kombination mit anderen bekannten Interferonen oder biologisch aktiven Produkten eingesetzt werden, beispielsweise mit IFN- γ , IL-2, 25 anderen Immun-Modulatoren und Ähnlichen.

Ein IFN-omega/ α -Hybrid wie IFN-omegal/ α 2(BglII) kann parental verabreicht werden in Fällen, in denen Antitumor oder antivirale Behandlung erforderlich ist, und zur antiviralen Prophylaxe in immunsupprimierten Patienten. Dosierung und 30 Dosierungsrate können ähnlich denen sein, die zur Zeit bei klinischen Untersuchungen für IFN- α -Materialien gelten z.B. ca. (1-10) x 10⁶ Einheiten täglich und bei Präparaten, die

zu mehr als 1 % rein sind, bis zu beispielsweise
5 x 10⁶ Einheiten täglich.

- Beispielsweise können für eine zweckmäßige Dosierungsform bei einem im wesentlichen homogenen, bakteriell produzierten
- 5 IFN-omegal/ α 2(BglII), bei parenteraler Verwendung 3 mg IFN-omegal/ α 2(BglII) in 25 ml 5%igem menschlichem Serum Albumin gelöst werden. Diese Lösung wird dann durch ein bakteriologisches Filter gegeben, und die gefilterte Lösung aseptisch auf 100 Fläschchen verteilt, von dem jedes
- 10 6 x 10⁶ Einheiten reines IFN-omegal/ α 2(BglII) zur parenteralen Applikation geeignet, enthält. Die Gläschen werden vor Verwendung vorzugsweise kühl (-20°C) aufbewahrt. Die erfindungsgemäßen Substanzen können in bekannter Weise formuliert werden, um pharmazeutisch verwendbare Mittel zu erhalten, wobei das erfindungsgemäße Polypeptid mit einer pharmazeutischen, akzeptablen Trägersubstanz vermischt wird. Ge- Δ bräuchliche Trägerstoffe und ihre Formulierung sind bei E.W. Martin in Remington's Pharmaceutical Sciences beschrieben, worauf ausdrücklich Bezug genommen wird. IFN-omegal/ α 2(BglII) wird mit einer angemessenen Menge des Trägerstoffes vermischt, um geeignete pharmazeutische Mittel zu schaffen, die für eine effektive Anwendung beim Empfänger (Patienten) geeignet sind. Bevorzugt wird eine parenterale Applikation vorgenommen.
- 25 Desweiteren eignen sich die neuen Hybridinterferone zur Herstellung von Antikörpern gegen diese Interferone, insbesondere das IFN-omegal/ α 2(BglII), die zugleich auch die parenteralen Interferone IFN- α 2 und IFN-omegal erkennen. Die so hergestellten Antikörper sind daher für die Immunaффinitäts-
- 30 chromatographie von omega-Interferonen geeignet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind somit neue monoklonale Antikörper-produzierende Hybridzelllinien, Verfahren zu deren Herstellung und ein Verfahren zur

Herstellung von monoklonalen Antikörpern der Maus mit Spezifität für IFN- α und omegal-Interferon, insbesondere für omegal-Interferon.

Die neuen monoklonalen Antikörper sind daher insbesondere
5 zur Hochreinigung und zum Nachweis von omegal(Glu)- oder omegal(Gly)-Interferon geeignet.

Die hierfür erforderlichen Antikörper-produzierenden Hybridzelllinien erhält man durch Zellfusion von Milzzellen von mit einem Hybridinterferon wie IFN-omegal/ α 2(BglII) immunisier-
10 ten Mäusen mit Myelomzellen, z.B. Myelomzellen der Linie P3-X-63Ag8-653 (siehe Nature 266, 550-552 (1977)). Eine so erhaltene Zelllinie sezerniert große Mengen eines Antikörpers, der die antivirale Aktivität sowohl des zur Immunisierung eingesetzten Hybridinterferons als auch der beiden pa-
15 rentalen Interferone, z.B. im Falle des IFN-omegal/ α 2(BglII) die des omegal-Interferon und des IFN- α 2(Arg), neutralisieren kann und für die Affinitätschromatographie von omegal-Interferon geeignet ist.

Der so hergestellte Antikörper kann nach kovalenter Bindung
20 an einen biologisch inaktiven Träger zur Hochreinigung von omegal-Interferone oder IFN- α 2 verwendet werden.

Die kovalente Bindung des Antikörpers erfolgt hierbei an einen entsprechend aktivierten Träger, vorzugsweise auf Dextran-Basis, z.B. an CNBr-aktivierte Sepharose oder CH-aktivierte Sepharose der Firma Pharmacia, Uppsala. Zur Hochrei-
25 nigung wird eine Lösung des zu reinigenden omegal-Interferons, welches zweckmäßigerweise entweder gemäß den in der EP-A-0.170.204 beschriebenen Verfahren oder erfindungsgemäß mit Hilfe der vorstehend beschriebenen neuen Plasmide erhalten wird, bei schwach basischen pH, z.B. bei einem pH
30 7-8, vorzugsweise jedoch bei einem pH 7,5, über einen so hergestellten Antikörper-Affinitätsträger gepumpt, solange

bei pH 7,5 gewaschen bis das Eluat proteinfrei ist, und anschließend das gebundene Interferon im sauren Bereich, z.B. mit Hilfe von 0,1 molarer Zitronensäure in 25%igem Äthylenglykol, eluiert. Die so erhaltenen proteinhaltigen Fraktionen werden anschließend über einen stark sauren Kationenaustauscher, z.B. den Kationenaustauscher Mono-S der Firma Pharmacia, chromatographiert. Hierbei wird das Humaninterferon des obigen Eluats sofort von der Kationenaustauschersäule adsorbiert und anschließend mit Hilfe eines NaCl-Gradienten eluiert.

Die für die Durchführung der vorliegenden Anmeldung erforderlichen Basisplasmide sind in Sachen der EP-A-0.115.613 bzw. der EP-A-0.170.204 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen hinterlegt worden, z.B.

- 15 pER103 unter der DMS-Nr. 2773 am 20. Dezember 1983,
E76E9 unter der DMS-Nr. 3003 und
P9A2 unter der DMS-Nr. 3004 jeweils am 4. Juli 1984,

wobei für diese Klone bereits die erforderliche Freigabeerklärung abgegeben wurde. Unter Verwendung dieser Plasmide ist es dem Fachmann auf diesem Gebiet ohne weiteres möglich den Gegenstand der vorliegenden Erfindung an Hand der EP-A-0.115.613 und der EP-A-0.170.204 (siehe auch Nucleic Acids Res. 13, 4739-4749 (1985)) nachzuarbeiten.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne diese jedoch einzuschränken:

Vorbemerkung

Alle Enzymreaktionen werden unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Beispiel 1:

5 Herstellung von parpATER33

10 μ g parpER33 werden in 200 μ l Reaktionslösung mit je 20 Einheiten BamHI und PstI geschnitten. Anschließend werden die zwei entstehenden Fragmente in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (1% Agarose in 1x TBE-puffer: 10,8 g/l Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 5,5 g/l Borsäure, 0,93 g/l Äthylendinitrijo-tetraessigsäure-dinatriumsalz (EDTA) und 0,5 mg/l Äthidiumbromid (EtBr), Laufpuffer ist 1x TBE; Elektrophorese bei ca. 5V/cm; Sichtbarmachen der DNA-Fragmente durch Bestrahlung des Agarosegels mit UV-Licht (254 nm)). Das kleinere, das Interferon-alpha2-Arg (IFN- α 2(Arg)) enthaltende Fragment wird isoliert (Elektrophorese der DNA-Bande auf DE-81 Papier (Whatman), Waschen des Papiers mit 200 mM NaCl, 25 mM Tris pH=7,5, 1 mM EDTA und Elution der DNA mit 1 M NaCl, 25 mM Tris, pH=7,5, 1 mM EDTA) und durch Zusatz von 2,5 Vol Äthanol wird die DNA ausgefällt. Nach dem Abzentrifugieren wird die DNA getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (10 mM Tris pH=8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen.

25 10 μ g pAT153 werden ebenfalls in 200 μ l Reaktionslösung mit je 20 Einheiten BamHI und PstI geschnitten, und die zwei entstehende Fragmente separiert. Von pAT153 isoliert man das größere, den Replikationsursprung enthaltende Fragment.

- Jeweils 0,5 µg der gereinigten DNA Fragmente werden in 20 µl Reaktionslösung (66 mM Tris, pH=7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM EDTA, 1 mM Adenosin-triphosphat (ATP)) mit 5 Einheiten T₄ DNA-Ligase ligiert.
- 5 Anschließend werden 150 µl kompetente E.coli HB 101-Bakterien (F⁻, hsdS20(r⁻, m⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20(Smr), xyl-5, mtl-1, supE44, lambda⁻) mit 1 µl der Ligasereaktion versetzt, 30 Minuten bei 0°C inkubiert, und durch 2 Minuten 42°C Inkubation mit der DNA
- 10 transformiert (Kompetente E.coli Bakterien: E.coli wird in LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Yeast Extract, 5 g/l NaCl, pH=7,5) bis zu OD_{600nm}=0,3 wachsen gelassen und abzentrifugiert. Die Bakterien werden in 0,5 Vol eiskalter 50 mM CaCl₂ Lösung resuspendiert und 30 Minuten inkubiert. Nach
- 15 erneuter Abzentrifugieren werden die Bakterien in 1/15 Vol des Ausgangsvolumens 50 mM CaCl₂ resuspendiert). Die Bakteriensuspension wird auf LB-Agar (LB-Medium plus 15 g/l Agar) mit 50 µg/ml Ampicillin plattiert. Nach 16 Stunden Inkubation bei 37°C werden 12 der entstandenen Kolonien ausge-
- 20 wählt und von diesen im Mikromaßstab die Plasmide isoliert (Birnboim, H.C. and Doly, J., Nucl. Acids Res. 7, 1513 (1979)). Die Richtigkeit der Konstruktion wird durch Restriktionsenzymdoppelverdauung mit PstI-BamHI, PstI-PvuII und EcoRI-BamHI und mit anschließender Gelelektrophorese
- 25 durch das Auftreten der erwarteten Fragmente bestätigt. Ein Plasmid wird ausgewählt und mit parpATER33 bezeichnet. E.coli transformiert mit parpATER33 zeigt den Phänotyp Ap^r (Ampicillin-Resistenz), Tc^r (Tetracyclin-Resistenz).

Beispiel 2

30 Herstellung von pRHW14

10 µg parpATER33 werden in 150 µl Reaktionslösung mit HindIII und BamHI doppelt verdaut. Die drei resultierenden

DNA Fragmente werden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, und das größte, ca. 3750 Basenpaare (bp) lange Fragment isoliert (Fragment a)). Dieses Fragment trägt den Tryptophan Promotor/Operator (*Serratia marcescens*), den Replikationsursprung, sowie das Ap^r-Gen.

10 µg pRHW12 werden ebenfalls in 150 µl Reaktionslösung mit BamHI und HindIII doppelt verdaut. Die zwei entstehenden Fragmente werden gelelektrophoretisch aufgetrennt, und das kleinere, ca. 800 bp lange Fragment isoliert, welches das IFN-omegal(Gly)-Gen enthält (Fragment b)).

40 ng Fragment a) werden mit ca. 50 ng Fragment b) in 10 µl Reaktionslösung mit 5 Einheiten T₄ DNA-Ligase ligiert.

200 µl kompetenter E.coli HB101 Suspension werden mit der Ligasereaktionslösung gemischt, die Bakterien durch Hitzeschock auf 42°C transformiert und auf LB-Agar plus 50 µg/ml Ampicillin plattiert. Nach 16 Stunden Inkubation bei 37°C werden sechs Kolonien ausgewählt, und aus den Bakterien im Mikromaßstab die Plasmid DNA isoliert. Nach dem Verdauen der DNA mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI, HindIII, NcoI

bzw. PstI und anschließender gelelektrophoretischer Analyse der Fragmente zeigte sich, daß eines der Plasmide die gewünschte Struktur aufweist. Dieses Plasmid wird mit pRHW14 bezeichnet. E.coli transformiert mit pRHW14 zeigt den Phänotyp Ap^r und Tc^s.

25 Beispiel 3

Nachweis der Plasmid-kodierten Proteine

Der Nachweis Plasmid-kodierter Proteine ist im Maxizell System möglich (Sancar. A., Hack, A.M. and Rupp, W.D., J.Bacteriol. 137, 692-693 (1979)).

30 Hierzu wird E.coli CSR603 (F⁻, thr-1, leuB6, proA2, phr-1, recA1, argE3, thi-1, uvrA6, ara-14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, gyrA98 (nalA98), rpsL31, tsx-33, lambda⁻, supE44),

- transformiert mit den Plasmiden pRHW12 und pRHW14, im Expressionsmedium (10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, 3,5 g/l KH_2PO_4 pH=7,3, 0,5 g/l NaCl, 21 g/l Caseinhydrolysat (säurehydrolysiert, vitaminfrei), 11 g/l Glucose, 1 mM MgSO_4 , 0,1 mM CaCl_2 , 1 mg/l Thiamin-HCl, 20 mg/l L-Cystein, 100 mg/l Ampicillin) bis zu einer Dichte von $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,6$ bei 37°C gezüchtet. 10 ml Kultur werden in einer offenen Petrischale mit einer UV-Germicidlampe (15W) aus 50 cm Entfernung 5 Sekunden lang bestrahlt und eine Stunde weiter inkubiert. Den Kulturen werden 100 µg D-Cycloserin zugesetzt, um noch vermehrungsfähige Bakterien abzutöten. Nach 16 Stunden Inkubation bei 37°C werden die Bakterien abzentrifugiert, zweimal mit je 5 ml Hershey-Salzlösung gewaschen (5,4 g/l NaCl, 3,0 g/l KCl, 1,1 g/l NH_4Cl , 15 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,2 mg/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 87 mg/l KH_2PO_4 , 12,1 g/l Tris pH=7,4), in 5 ml Hershey-Medium (pro 100 ml Hershey-Salze: 2,0 ml 20% Glucose, 0,5 ml 2% Threonin, 1,0 ml 1% Leucin, 1,0 ml 2% Prolin, 2% Arginin, 0,1 ml 0,1% Thiamin-HCl) plus 20 µg/ml Indolacrylsäure (IAA) inkubiert. Durch Zusatz von 5 µCi/ml ^{35}S -Methionin und weiterer Inkubation bei 37°C für eine Stunde werden neu-synthetisierte Proteine radioaktiv markiert. Die Bakterien werden abzentrifugiert und in 200 µl Na-Dodecylsulfat(SDS)-Probenpuffer (6,6 mM Na-Phosphat pH=6,8, 2 mM EDTA, 2% SDS, 3% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau, 0,66% 2-Mercaptoäthanol) 5 Minuten bei 100°C lysiert. Die Proben werden anschließend in einem 15%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt (Trenngel: 15% Acrylamid, 0,4% Bisacrylamid, 375 mM Tris pH=8,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS; Sammelgel: 6% Acrylamid, 0,16% Bisacrylamid, 375 mM Tris pH=6,8, 2 mM EDTA, 0,1% SDS; Elektrodenpuffer: 3,0 g/l Tris, 14,24 g/l Glyzin, 0,335 g/l EDTA, 0,5 g/l SDS; Elektrophoresedauer: 16 Stunden bei konstant 20 mA). Das Gel wird eine Stunde in 20% Methanol, 7,5% Essigsäure fixiert, 30 Minuten in 5% Methanol, 1% Glycerin inkubiert und in einem Geltdrockner getrocknet. Das Gel wird unter Verwendung einer Verstärkerfolie (Kodak) bei -80°C auf Kodak X-Omat S Röntgenfilm exponiert.

Das Ampicillin-Resistenzgenprodukt (β -Lactamase) wird in beiden Fällen gleich stark markiert. IFN-omegal ist jedoch im Falle des pRHW14 mehr als doppelt so stark markiert als bei pRHW12 (siehe Figur 3).

5 Beispiel 4

Extraktion von IFN-omegal(Gly) aus Bakterien

E.coli HB101 transformiert mit pRHW12 bzw. pRHW14 wird in Expressionsmedium plus 20 μ g/ml IAA bis zu einer $OD_{600nm}=20$ angezüchtet. Die Bakterien werden durch Zusatz
10 von H_2SO_4 bis pH=2 und 60-minütige Inkubation bei 20°C abgetötet. Die Bakterien werden abzentrifugiert, und die Biomasse bei -20°C bis zur Aufarbeitung eingefroren. Die Bakterien werden in 10 Vol 1% Essigsäure resuspendiert. Der
15 pH-Wert der Lösung wird durch Zusatz von 2 N NaOH auf 10 eingestellt, und die Suspension bei 0°C zwei Stunden gerührt. Danach wird mit 2 N HCl wieder ein pH-Wert von 7,5 eingestellt und die Zelltrümmer abzentrifugiert (J2-21 Zentrifuge (Beckman), JA10 Rotor, 4°C, 10000 rpm, 30 Minuten). Die Interferon-Aktivität im Überstand (Rohextrakt) wird mit-
20 tels des Cytopathischen Effekt (CPE) Reduktionstests auf humanen A549 Zellen (menschliche Lungenkarzinom Zelllinie), mit Encephalomyocarditis (EMC) Virus infiziert, unter Verwendung von IFN- α 2(Arg) als Standard gemessen. Dabei liefert die Biomasse von E.coli transformiert mit pRHW12 100.000
25 Einheiten/Gramm (Mittelwert aus drei unabhängigen Züchtungen), während der Klon pRHW14 200.000 Einheiten/Gramm Biomasse (15 Züchtungen) liefert.

Beispiel 5

Konstruktion des Hybridinterferon Expressionsklons pRH72

30 10 μ g parpATER33 bzw. pRHW14 werden in je 130 μ l Lösung mit

- BglII und SphI doppelt verdaut. Die entstandenen Fragmente werden auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt, die DNA's eluiert und durch Präzipitation gereinigt. Die Fragmente werden in 20 µl TE gelöst. Das Expressionsplasmid für
- 5 IFN-α2/omegal(BglII) wird durch Ligasereaktion von 1 µl großem Fragment aus parpATER33 mit 5 µl kleinem Fragment von pRHW14 in insgesamt 20 µl unter Verwendung von 5 Einheiten T₄ DNA-Ligase hergestellt. Nach der Transformation von E.coli HB101 werden die Plasmide einiger der resultierenden,
- 10 Ampicillin resistenten Klone im Mikromaßstab isoliert, und die Richtigkeit der Konstruktion durch doppelte Restriktionsenzymverdauung mit BglII/SphI überprüft. Eines der Plasmide wird ausgewählt und mit pRH72 bezeichnet. E.coli transformiert mit diesem Plasmid besitzt den Phänotyp Ap^r,
- 15 Tc^s.

Beispiel 6

Konstruktion der Plasmide pRH78r und pRH78f

- 1 µl des großen Fragments von pRHW14 wird mit 5 µl des BglII(2)-SphI-Fragments aus parpATER33, das den C-Terminus
- 20 des IFN-α2(Arg) kodiert, in 20 µl Reaktionslösung mit 5 Einheiten T₄ DNA-Ligase ligiert. Mit dem entstehenden Plasmid wird E.coli HB101 transformiert und wie in Beispiel 5 beschrieben, ein Plasmid der gewünschten Konstruktion gesucht. Dieses Zwischenplasmid wird mit pRH77 bezeichnet. Um
- 25 das Gen für das Hybridinterferon-omegal/α2(BglII) zu komplettieren, muß das beim Schnitt von parpATER33 mit BglII entfernte Fragment in pRH77 eingebracht werden. Hierzu werden 10 µg pRH77 in 50 µl Lösung mit BglII geschnitten, das Volumen der Lösung mit 2x CIP-Puffer verdoppelt (CIP: Kalbs-
- 30 darm-Phosphatase, 2x CIP-Puffer: 100 mM Tris pH=9,0, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM ZnCl₂), und das 5'-terminale Phosphat durch Zusatz von 1 Einheit CIP (Boehringer Mannheim) ent-

- fernt (60 Minuten 37°C). Die linearisierte Form von pRH77 wird durch Agarosegelelektrophorese und Elution der DNA mit anschließender Präzipitation gereinigt. Die DNA wird in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und 1 µl davon mit 5 µl des 263 bp Fragments (BglII(1)-BglII(2)-Fragment), das beim Verdauen des parpATER33 mit BglII/SphI gewonnen wird, in insgesamt 10 µl Reaktionslösung mit 5 Einheiten T₄ DNA-Ligase ligiert. E.coli HB101 wird transformiert, und die DNA von sechs entstandenen Kolonien analysiert. Da die Insertion des 263 bp Fragments auf Grund der identischen Enden in zwei Orientierungen erfolgen kann, werden die Plasmide mit den Restriktionsendonukleasen AluI und HaeIII auf die Richtigkeit der Konstruktion hin untersucht. Das Plasmid, in dem das BglII-Fragment in der für die Expression richtigen Lage insertiert wurde, wird mit pRHW78r, jenes mit der für Expression falschen Orientierung mit pRH78f bezeichnet. E.coli transformiert mit pRH78r bzw. pRH78f zeigt den Phänotyp Ap^r, Tc^r.

Beispiel 7

- 20 Lysattest zur Feststellung von Interferon-(antiviraler) Aktivität

- E.coli transformiert mit den diversen Plasmiden wird in 35 ml Expressionsmedium plus 20 µg/µl IAA bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} = 0,6 angezüchtet. Die Bakterien werden abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 3,5 ml 50 mM Tris pH=7,6/30 mM MgCl₂-Lösung aufgenommen und unter Eiskühlung mit einem Ultraschall Desintegrator (MSE, Soniprep 150) mit maximaler Leistung beschallt. Die Suspension wird 10 Minuten zentrifugiert (J2-21 Zentrifuge, 10.000 rpm, 4°C, JA20-Rotor), und der Überstand steril filtriert. Die antivirale Aktivität der Lösung wird mittels des CPE-Reduktionstests (A549-Zellen, EMC-Virus) bestimmt.

E.coli transformiert mit pRH72 (IFN- α 2/omegal(BglIII)) ergibt keine antivirale Aktivität ebenso wie E.coli transformiert mit pRH78f, das die ersten 64 Aminosäuren von reifen IFN-omegal, gefolgt von einem Serin kodiert.

- 5 Demgegenüber zeigt das IFN-omegal/ α 2(BglIII), wobei der Klon pRH78r ca. 30×10^6 Einheiten Interferon (verglichen mit IFN- α 2(Arg) als Standard) pro Liter Kultur und pro $1 \text{ OD}_{600 \text{ nm}}$ Bakteriendichte produziert, eine etwa viermal höhere spezifische antivirale Aktivität auf A549 Zellen als 0 IFN- α 2(Arg).

In der folgenden Tabelle sind die Aminosäureänderungen des Hybridinterferons IFN-omegal/ α 2(BglIII) gegenüber IFN- α 2(Arg) aufgelistet:

	Position	IFN- α 2(Arg)	IFN-omegal/ α 2	Übergang
5	7	Thr	Asn	p >> p
	9	Ser	Gly	p >> p
	11	Gly	Leu	p >> l
	14	Arg	Asn	b >> p
	17	Met	Val	(1) >> l
0	20	Ala	His	l >> b
	27	Leu	Pro	l >> l
	29	Ser	Leu	p >> l
	38	Gly	Arg	p >> b
	43	Glu	Met	a >> (1)
5	44	Phe	Val	ar >> l
	45	O	Lys	o >> b
	47	Asn	Ser	p >> p
	49	Phe	Leu	ar >> l
	53	Glu	His	a >> b
0	54	Thr	Val	p >> l
	55	Ile	Met	l >> (1)
	56	Pro	Ser	l >> p
	62	Ile	Leu	l >> l

Legende:

a: sauer, ar: aromatisch, b: basisch, l: apolar, p: polar
0: keine Aminosäure an dieser Position

Unterschiede bei den Ladungen (Position):

- | | | |
|---|--------------------------------------|----------------|
| 5 | 1) Verlust von 1 positiven Ladung: | 14 |
| | 2) Gewinn von 4 positiven Ladungen: | 20, 38, 45, 53 |
| | 3) Verlust von 2 negativen Ladungen: | 43, 53 |

Das Hybrid hat 5 positive Ladungen mehr als IFN- α 2(Arg).

Beispiel 9:

10 Reinigung des IFN-omegal/ α 2(Bq1II)

- 145 g säurebehandelte und bei -20°C gefrorene E.coli des Klones HB 101/pRH78r werden in 1450 ml 1% Essigsäure bis zur völligen Verteilung des Materials unter Eiskühlung gerührt (etwa 30 Minuten) und sodann 2 x 1 Minute lang mit dem
- 15 Ultra-Turrax T 45/6 (Janke und Kunkel) bei 10.000 UpM homogenisiert. Anschließend wird Polymin P (Serva, Kat.Nr. 33141) bis zu einer Konzentration von 0,25% zugegeben und der pH mit 5 N NaOH auf 10,0 eingestellt. Nach 2 Stunden Rühren unter Eiskühlung wird der pH mit 5 N HCl auf 7,5 ein-
- 20 gestellt und eine Klärung des Rohextraktes durch Zentrifugation vorgenommen (Christ Cryofuge 6-6 S, 3000 UpM, 1 Stunde, etwa 4°C).

- Zur Fällung des Interferons wird der Rohextrakt mit 430 g/Liter Ammoniumsulfat versetzt und zur vollständigen Fällung 16 Stunden bei 4-8°C stehen gelassen. Der Niederschlag wird dann durch Zentrifugation gewonnen (Beckman Zentrifuge J 2-21, Rotor JA10, 10.000 UpM, 60 Minuten, 4-8°C). Das Ammonsulfat-Pellet wird in 145 ml 0,01 M NaCl aufgenommen
- 25

- und die Suspension mit 5 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Nach 3 Stunden Rühren (Eiskühlung) wird die Lösung klarzentrifugiert (Beckman J2-21, Rotor JA10, 10 000 UpM, 4°C, 60 Minuten) und mit Hilfe einer Nephross-Allegro Dialysierpatrone (Fa. Organon) gegen 0,01 M NaCl solange dialysiert, bis die Interferonlösung eine Osmolarität von 370 mOsmol/l aufwies.
- 5 Tandem-Chromatographie: Zur chromatographischen Reinigung wird eine Säule aus 75 g DE-52 Zellulose (Whatman) mit 0,025 M Tris/HCl + 0,2 M NaCl, pH 7,5 äquilibriert und vor
- 10 eine Affinitätssäule (60 ml) vorgeschaltet, die den monoklonalen Antikörper EBI-1 (siehe EP-A-0.119.476), gekuppelt an Sepharose 4B (mit Hilfe von BrCN-aktivierter Sepharose 4B, Pharmacia, hergestellt) enthält. Die Affinitätssäule enthält
- 15 480 mg des monoklonalen Antikörpers EBI-1, sie wird ebenfalls mit Tris/HCl + NaCl pH 7,5 wie oben beschrieben äquilibriert. Die Interferonlösung wird durch die beiden Säulen gepumpt und solange mit 0,025 M Tris/HCl + 0,2 M NaCl nachgewaschen, bis im Eluat nur mehr eine Extinktion OD_{280nm} von unter 0,1 gemessen wird. Danach wird die Vorsäule (DE-52
- 20 Zellulose) abgekuppelt, und die EBI-1 Säule solange weiter gewaschen, bis das Eluat proteinfrei ist (OD_{280nm} im Eluat unter 0,01). Das adsorbierte Interferon wird nunmehr mit Hilfe von 0,1 M Zitronensäure in 25%igem Äthylenglykol eluiert. Der Proteinpeak wird gesammelt.
- 25 Das saure Eluat der Antikörpersäule wird mit 2 N Ammoniak auf pH 4,5 eingestellt, und der entstandene Niederschlag abzentrifugiert.
- Die letzte Reinigungstufe ist eine Ionenaustausch-Chromatographie an dem Träger MONO-S (Pharmacia). Eine Säule von
- 30 1 ml Bettvolumen (HR 5/5) wird an eine FPLC-Apparatur angeschlossen (Pharmacia) und in 0,1 M Na-Citrat pH 4,2 äquilibriert. Die IFN-Lösung wird aufgetragen, und das adsorbierte Interferon mit Hilfe eines pH-Gradienten eluiert (Puffer A: 0,1 M Na-Citrat pH 4,2 und Puffer B: 0,1 M Na-Phosphat pH
- 35 8,0). Das Interferon-omegal wird bei einem pH von 7,0 eluiert und der IFN-Peak gesammelt (siehe Fig.6).

Übersicht über die Reinigung von IFN-omegal/ $\alpha 2$ (BglII)

Ausgangsmaterial: 145 g E.coli HB 101/pRH78r

	Vol. (ml)	IFN ^{x)} (Einh.)	Protein ^{xx)} (mg)	Einh. /mg	Ausb. (%)
5 Rohextrakt	1470	$16,9 \times 10^9$	3000	$5,6 \times 10^6$	100
nach Fällung Ammon- sulfat u. Dialyse	246	$14,0 \times 10^9$	1970	$7,1 \times 10^6$	83
Eluat der Anti- körpersäule	11,1	$10,3 \times 10^9$	12,9	800×10^6	61
10 Überstand pH 4,5	11,9	$7,4 \times 10^9$	9,3	800×10^6	44
Pool nach MONO-S	6,9	$4,6 \times 10^9$	7,0	660×10^6	27

x) Die Bestimmung des Interferon-Gehalts erfolgt durch Messung der antiviralen Aktivität (CPE-Reduktionstest) mit Hilfe von A549-Zellen und Encephalomyocarditis-Virus (EMC-Virus). Als
15 Standard dient IFN- $\alpha 2$ (Arg).

xx) Die Proteinbestimmung erfolgt mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays. Der Standard war Serumalbumin.

Beurteilung der Reinigung

Das gereinigte Hybridinterferon-omegal/ $\alpha 2$ (BglII) ist homogen
20 (siehe hierzu Fig. 7 - Gelpermeations-HPLC). Die erreichte spezifische Aktivität von etwa 800×10^6 Einheiten/mg Protein ist höher als die von IFN- $\alpha 2$ (Arg) (ca. 300×10^6 Einheiten/mg Protein).

Beispiel 10

Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen HuIFN-omegal

a) Immunisierung:

Zwei weibliche, etwa acht Wochen alte Balb/c-Mäuse werden

- 5 mit hochgereinigtem IFN-omegal/ α 2(BglII) (Reinheit >95%,
gelöst in 0.1 M Natriumphosphat/Natriumcitrat pH 7) wie
folgt immunisiert:

1. Immunisierung: 100 μ g IFN-omegal/ α 2(BglII) in einer Emul-
sion mit komplettem Freund's Adjuvans, intraperitoneal in-

10 jiziert

2. Immunisierung: 100 μ g IFN-omegal/ α 2(BglII) in einer Emul-
sion mit inkomplettem Freund's Adjuvans, ein Monat nach der
ersten Immunisierung intraperitoneal injiziert

Zehn Tage nach der zweiten Immunisierung werden Blutproben

- 15 gewonnen. Die Fähigkeit der Seren, die antivirale Aktivität
von HuIFN-omegal, HuIFN- α 2(Arg) und IFN-omegal/ α 2(BglII) zu
neutralisieren, wird wie folgt getestet:

100 μ l einer Verdünnung der Serumprobe in Zellkulturmedium
werden mit 100 μ l einer IFN-Lösung (jeweils 100 antivirale

- 20 Einheiten/ml) in Zellkulturmedium gemischt und 90 Minuten
bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die antivirale Aktivi-
tät der Proben im biologischen Test (A549 Lungenkarzinom-
zellen, Encephalomyocarditis Virus) bestimmt:

25	Serum verdünnung	Maus 1		Maus 2			
		omegal α 2(Arg)		IFN-Präparat omegal/ α 2 omegal α 2(Arg) omegal/ α 2			
30	1: 100	+	+	+	-	-	+
	1: 1 000	-	-	+	-	-	+/-
	1:10 000	-	-	-	-	-	-

Symbole: + vollständige Neutralisierung, +/- partielle Neutralisierung, - keine neutralisierende Wirkung

Vier Wochen nach der zweiten Immunisierung erhält Maus 1 eine intravenöse Injektion von weiteren 100 µg IFN-omegal/-
5 α2(BglIII). Drei Tage später wird die Milz entnommen und zur Herstellung von Hybridomen eingesetzt.
Drei Wochen nach der zweiten Immunisierung wird Maus 2 neuerlich immunisiert; 100 µg IFN-omegal/α2(BglIII) werden intraperitoneal, 100 µg IFN-omegal/α2(BglIII) subkutan appli-
10 ziert. Zwei Wochen später wird eine weitere Serumprobe gewonnenen, die im oben beschriebenen Test bei einer Verdünnung von 1:100 eine partiell neutralisierende Wirkung für HuIFN-omegal zeigt. Vier Wochen nach der dritten Immunisierung wird eine intravenöse Injektion von 100 µg IFN-omegal/-
15 α2(BglIII) gegeben, vier Tage später die Milz entnommen und zur Herstellung von Hybridomen eingesetzt.

b) Herstellung und Screening von Hybridomen

Die Herstellung von Hybridomen erfolgt nach der ursprünglich von Köhler und Milstein (Nature 256, 495 (1975)) entwickelten Methode unter Verwendung der nicht-sezernierenden Zelllinie P3X63Ag8.653 (Kearney et al., J.Immunol. 123, 1548 (1979)). Zur Fusion wird 50% Polyäthylenglykol 4000 mit 5% Dimethylsulfoxid eingesetzt. Die Selektion der Hybridzellen in HAT-Medium erfolgt ebenfalls mit Hilfe bekannter Verfahren (siehe Monoclonal Antibodies: Production and Maintenance, Lovborg, U. William Heinemann Medical Books, London 1982; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet, R.H., McKearn, T.J., and Bechtol, K.B., Herausgeber: Plenum Press, New York and London 1980). Aus beiden Fusionen werden insgesamt 730 Hybridomkulturen erhalten. Das Screening wird wie folgt durchgeführt:

Kulturüberstände von mindestens 10-20% konfluenten Hybridomkulturen werden mit gleichen Volumina einer Lösung von HuIFN-omegal (20 antivirale Einheiten/ml) gemischt, 90 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend auf ihre antivirale Aktivität getestet. Alle Kulturen werden in Abständen von jeweils einer Woche mindestens zweifach getestet. Nur eine der 730 Hybridomkulturen zeigt in allen Tests konsistent eine Reduktion der antiviralen Aktivität. Diese Kultur, im folgenden OMG-2 genannt, wird durch limitierende Verdünnung subkloniert, die Subklone erneut im beschriebenen Testverfahren auf Aktivität getestet. Mehrere positive Subklone werden in mit Pristan vorbehandelte Mäuse inokuliert. Einer der Subklone führte in allen Mäusen zur Bildung von Antikörper-enthaltender Ascites-Flüssigkeit. Durch Fällung mit 50% gesättigter Ammonsulfatlösung wird der enthaltene Antikörper partiell gereinigt. Das resultierende Präparat enthält Antikörper in etwa 75%iger Reinheit (bestimmt durch Gelpermeations-Hochdruckflüssigkeitschromatographie). Etwa 10 mg Antikörper kann aus einem Milliliter Ascites-Flüssigkeit gewonnen werden. Eine weitere Reinigung bis zu einer Reinheit von über 95% wird durch Anionenaustausch-Chromatographie erzielt.

c) Charakterisierung des Antikörpers OMG-2

In der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigt der Antikörper OMG-2 ein Molekulargewicht von etwa 150 000. In der Gelpermeations-Hochdruckflüssigkeitschromatographie zeigt der Antikörper ein mit einem IgG-Markerprotein identisches Retentionsverhalten. Der Antikörper ist somit wahrscheinlich vom IgG-Typ.

Im Neutralisationstest (siehe Beispiel 10b) werden mit einem durch Ammonsulfat-Fällung partiell (siehe Beispiel 10b) gereinigtem Antikörper folgende Ergebnisse erhalten:

	Antikörper-Konzentration µg/ml	IFN-Präparation		
		omegal	alfa2	omegal/α2
5	5 000	+/-	+/-	
	1 000	-	-	+
	100	-	-	+
	10	-	-	+/-
	1			-

Der Antikörper zeigt somit starke neutralisierende Wirkung
 10 gegen das zur Immunisierung der Mäuse eingesetzte Hybrid-
 IFN-omegal/α2(BglII), aber nur eine etwa 500-fach schwächere
 Wirkung gegen HuIFN-α2(Arg) und HuIFN-omegal. Trotz der of-
 fensichtlich relativ geringen Affinität zu HuIFN-omegal kann
 15 der Antikörper OMG-2 erfolgreich für die Immunaффinitäts-
 chromatographie dieses Interferons eingesetzt werden (siehe
 Beispiel 11).

Beispiel 11

Reinigung von IFN-omegal

a) Extraktion und CPG-Chromatographie:
 20 794 g säuregefällte und bei -20°C tiefgefrorene E.coli des
 Klones pRHW14 werden in 7700 ml 1%iger Essigsäure unter Eis-
 kühlung bis zur völligen Verteilung des Materials gerührt
 (etwa 30 Minuten) und mit Hilfe von 2N NaOH auf pH 10 einge-
 stellt. Nach 2-stündigem Rühren unter Eiskühlung wird die
 25 Suspension auf pH 7,5 eingestellt (2N HCl) und klarzentrifu-
 giert (1 Stunde bei 10.000 UpM, 4°C, JA 10-Rotor der Beckman

Zentrifuge J2-21). Der klare Überstand wird mit 50 ml/Stunde über eine 500 ml-Säule aus CPG gepumpt (controlled pore glass, CPG 10-350, 120-200 mesh, Electro-Nucleonics Inc, USA) und anschließend die Säule gründlich mit 0.025 M Tris/HCl + 1 M NaCl (pH 7,5) nachgewaschen. Das an der Säule adsorbierte Interferon wird sodann mit 0,025 M Tris/HCl + 1 M KSCN in 50%igem Äthylenglykol (pH 7,5) eluiert (50 ml/Stunde). Der IFN-Pool wird sodann gegen 0,025 M Tris/HCl + 0,1 M NaCl dialysiert, wobei durch Zugabe von 10% Poly-
 5
 10 Äthylenglykol 40.000 zu der Außenlösung gleichzeitig eine Konzentrierung des IFN-Pools erreicht wird. Das dialysierte Konzentrat wird durch Zentrifugation geklärt (1 Stunde, 4°C, 15.000 UpM, JA-20 Rotor der Beckman Zentrifuge J2-20).

b) Affinitätschromatographie an OMG 2-Sepharose

15 Gereinigter monoklonaler Antikörper OMG-2 wird mit Hilfe von BrCN-aktivierter Sepharose 4B nach der Vorschrift des Herstellers (Pharmacia) an den Träger Sepharose 4B gekuppelt. Hierbei werden 16 mg des monoklonalen Antikörpers pro Gramm aktivierte Sepharose 4B eingesetzt. Für die beschriebene
 20 Trennung wird eine Affinitätssäule von 8 ml Volumen verwendet.

Das nach Beispiel 11a erhaltene Konzentrat der CPG-Säule wird mit 4 ml/Minute über die Affinitätssäule gepumpt und die Säule anschließend mit 0,025 M Tris/HCl + 0,1 M NaCl pH
 25 7,5 solange gewaschen, bis das Eluat proteinfrei war (OD_{280nm} des Eluates identisch mit der des Waschpuffers). Das gebundene Interferon wird sodann mit 2 ml/Minute mit Hilfe von 0,1 M Zitronensäure in 25% Äthylenglykol eluiert und der Proteinpeak (OD_{280nm}) gesammelt.

c) Ionenaustausch-Chromatographie an dem Träger MONO-S

Eingesetzt wird eine 1 ml-Säule (HR 5/5) des Trägermaterials MONO-S (beide Pharmacia), die an eine FPLC-Apparatur (Pharmacia) angeschlossen war. Die Ionenaustauschersäule wird mit 0,1 M K-Phosphat pH 6,0 in 25% Propylenglykol equilibriert und das nach Beispiel 11b erhaltene Eluat der Affinitätssäule mit 0,5 ml/Minuten durchgepumpt. Das adsorbierte Interferon wird sodann mit Hilfe eines NaCl-Gradienten eluiert (Puffer B: 0,1 M K-Phosphat + 1 M NaCl pH 6,0 in 25% Propylenglykol). Die Fraktionen (je 1 ml) werden auf Interferon-Aktivität getestet. Der erste Peak (OD_{280nm}) bei 46% Puffer B enthält das Interferon-omega (siehe Fig. 8).

d) Reverse-Phase-HPLC

Als stationäre Phase dient eine Bakerbond WP-RP 18 Säule, 4 x 250 mm, mit einem Partikeldurchmesser von 5 μm und einem Porendurchmesser von 300 Å.

Als mobile Phase dient ein Gradient von Acetonitril in 0,1 in 0,1% Trifluoressigsäure:

Puffer A: 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser,
Puffer B: 0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril,
Gradient von 20-68% B in 28 Minuten,
Fließrate: 1 ml/Minute,
Detection: OD_{214nm} .

Es werden 630 μg des gemäß Beispiel 11c erhaltenen Proteins (IFN-Pool nach MONO-S) aufgetragen. Das Eluat wird im Bereich von 48-65% B getestet. Das Interferon-omega eluiert bei einer Retentionszeit von 24,5 Minuten und 63% Puffer-B (siehe Fig. 9). Die Ausbeute beträgt 5 bis 10 μg , die spezifische Aktivität $>10^8$ Einheiten/mg Protein.

e) Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Der gemäß Beispiel 11d erhaltene IFN-omegal-Peak (RP-HPLC) wird in einer Speedvac-Zentrifuge getrocknet und in einem Sequenzer des Typs 470 A (Applied Biosystems) analysiert.

Folgende Aminosäuresequenz wird erhalten:

Xxx-Asp-Leu-Pro-Gln-Asn-Xxx-Gly-Leu-Leu-Ser-

1

5

10

Diese Sequenz bestätigt die aus der cDNA abgeleitete Reihenfolge der Aminosäuren (Cystein an der 1.Stelle ist ohne Reduktion und Alkylierung des Proteins nicht nachweisbar und Histidin an der 7. Position konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden).

Übersicht über die Reinigung von IFN-omegal:

1. Extraktion und CPG Chromatographie

15	Vol. (ml)	IFN ^x (Einh.)	Protein ^{xx} (mg)	Einh. /mg	Ausb. (%)
Rohextrakt	7700	190x10 ⁶	19.100	9.950	100
Pool nach CPG	425	53x10 ⁶	4.600	11.500	28
nach Dialyse	410	45x10 ⁶	1.650	27.300	24

20 2. Affinitätschromatographie an OMG 2-Sepharose

	Vol. (ml)	IFN ^x (Einh.)	Protein ^{xx} (mg)	Einh. /mg	Ausb. (%)
aufgetragen	350	40,6x10 ⁶	1.520	26.700	100
nicht adsorbiert	440	4,5x10 ⁶	-----	-----	11
25 Eluat IFN-omega	7	25,6x10 ⁶	2,84	9,0x10 ⁶	63

3. Ionenaustausch Chromatographie an MONO-S

	Vol. (ml)	IFN ^{x)} (Einh.)	Protein ^{xx)} (mg)	Einh. /mg	Ausb. (%)
aufgetragen	7	$7,14 \times 10^6$	2,84	$2,5 \times 10^6$	100
5 IFN omega-Pool	2	$3,04 \times 10^6$	0,72	$4,2 \times 10^6$	43

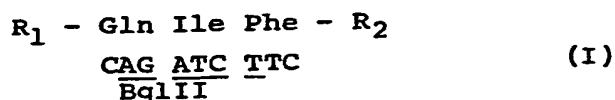
x) Die Bestimmung des Interferongehaltes erfolgt durch die Messung der antiviralen Aktivität (CPE-Reduktions-Test) mit Hilfe von A 549-Zellen und Encephalo-myocarditis-Virus (EMC-Virus). Standard: rIFN- α 2(Arg). Es handelt sich hierbei um den Mittelwert dreier unabhängiger Tests.

xx) Die Proteinbestimmung erfolgt mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays. Der Standard ist Serumalbumin.

Patentansprüche

1. Hybridinterferone, bestehend aus einem Teil eines α -Interferons und einem Teil eines omega-Interferons, deren N-terminale Met- oder N-Formyl-Met-Derivate und, falls die Peptidsequenz des Hybridinterferons eine Glykosylierungs-
5 stelle enthält, deren N-glykosylierte Derivate.

2. BglIII-Hybridinterferone gemäß Anspruch 1 mit der Formel



10 in der
BglIII die gemeinsame BglIII-Restriktionsstelle der α 1-,
 α 2- und omega-Interferone,
 R_1 die Peptidsequenz eines α 1- oder α 2-Interferons, vor-
zugsweise die des IFN- α 2(Arg), die durch die DNA-Sequenz
15 dieser Interferone vor der BglIII-Schnittstelle kodiert wird,
und R_2 die Peptidsequenz eines omega-Interferons, vorzugs-
weise die des omegal(Glu)- oder omegal(Gly)-Interferons, die
durch die DNA-Sequenz dieses Interferons nach der BglIII-
Schnittstelle kodiert wird, oder
20 R_1 die Peptidsequenz eines omega-Interferons, vorzugsweise
die des omegal(Glu)- oder omegal(Gly)-Interferons, die durch
die DNA-Sequenz dieses Interferons vor der BglIII-Schnitt-
stelle kodiert wird, und R_2 die Peptidsequenz eines α 1-
oder α 2-Interferons, vorzugsweise die des IFN- α 2(Arg), die
25 durch die DNA-Sequenz dieser Interferone nach der BglIII-
Schnittstelle kodiert wird, bedeuten, deren N-terminale
Met- oder N-Formyl-Met-Derivate und, falls die Peptidsequenz
des Hybridinterferons eine Glykosylierungsstelle enthält,
deren N-glykosylierte Derivate.

3. Arzneimittel, enthaltend ein Hybridinterferon gemäß den Ansprüchen 1 oder 2.

4. Verwendung eines Hybridinterferons gemäß den Ansprüchen 1 oder 2

- 5 a) zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von viralen Erkrankungen oder
b) zur Immunisierung von Versuchstieren und zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen ein Hybridinterferon gemäß Anspruch 1 oder 2, gegen α - und omega-Interferon.

10 5. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend eine kodierende Sequenz für die neuen Hybridinterferone gemäß den Ansprüchen 1 oder 2.

15 6. Vehikel kodierend für ein Hybridinterferon gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß dieses ein rekombinantes DNA-Molekül gemäß Anspruch 5 enthält, wobei vorzugsweise dieses zusätzlich die für die Expression erforderlichen Replikon- und Kontrollsequenzen und gegebenenfalls einen par-Lokus enthält.

20 7. Expressionsplasmid gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Expression erforderlichen Replikon- und Kontrollsequenzen aus dem Plasmid pER103 stammen und die Formel

5' AATTCACGCTGATCGCTAAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGACTTTGCCTTC
3' GTGCGACTAGCGATTGTTGTAACACGTTTTCTCCCACTGAAACGGAAG

25 K ————— Promotor —————

GCGAACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCAACGGTAAGGAGGTTTAAGCT
CGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGTTGCCATTCCTCCAAATTCGA
—Promotor/Operator—*_mRNA-Start—RBS—*—Link—

TAAAGATGTGT-----
 ATTTCTACACACTAG--
 -er*Gen-->

aufweisen, oder eine die Trp-Promotor-Aktivität erhaltende
 5 Modifikation.

8. Expressionsplasmide gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß im Plasmid parpATER33 gemäß Anspruch 25 das große BglIII/SphI-Fragment mit dem kleinem BglIII/SphI-Fragment des Plasmids pRHW13 oder pRHW14 gemäß Anspruch 10, wobei pRHW13
 10 für IFN-omegal(Glu) und pRHW14 für IFN-omegal(Gly) codiert, ligiert ist und durch die Restriktionskarte gemäß Fig. 4 am Beispiel des Plasmids pRH72, in welchem ω 1, die für IFN-omegal(Gly) codierende DNA-Sequenz darstellt, charakterisiert ist.

15 9. Expressionsplasmid pRH78r gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß in das mit BglIII-linearisierte Plasmid pRH77 gemäß Anspruch 27 das 263 bp lange SphI-BglIII-Fragment des Plasmids parpATER33 eingesetzt ist, und durch die Restriktionskarte gemäß Fig. 5 charakterisiert ist.

20 10. Expressionsplasmide für omegal-Interferon, dadurch gekennzeichnet, daß in dem Plasmid parpATER33 das HindIII-BamHI-Fragment durch das HindIII-BamHI-Fragment des Plasmids pRHW11, welches für IFN-omegal(Glu) codiert, oder pRHW12, welches für IFN-omegal(Gly) codiert, ersetzt ist, und durch
 25 die Restriktionskarte gemäß Fig. 2 am Beispiel des Plasmids pRHW14 charakterisiert ist.

11. Transformierter Wirtsorganismus wie ein Prokaryot oder ein Eukaryot, vorzugsweise jedoch E.coli HB101, der die genetische Information gemäß Anspruch 5 enthält, wobei vorzugs-
 30 weise die genetische Information in einem Vehikel, das die für die Replikation erforderlichen Replikon- und Kontrollsequenzen enthält, enthalten ist.

12. Bakterieller Wirt gemäß Anspruch 11, vorzugsweise E.coli HB101, transformiert mit einem Expressionsplasmid gemäß Anspruch 6, 7, 8, 9, 10, 25 oder 27.

5 13. Verfahren zur Herstellung der DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man diese durch Aufarbeiten eines Wirtsorganismus gemäß Anspruch 11 oder 12 erhält.

10 14. Verfahren zur Herstellung der Expressionsplasmide gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das große Fragment, das man durch Verdauen des Plasmids parpATER33 gemäß Anspruch 25 mit BglII und SphI erhält, mit dem kleinen Fragment, das man durch Verdauen eines Plasmids gemäß Anspruch 10 mit BglII und SpI erhält, ligiert, und anschließend zur Replikation E.coli HB101 mit dem so erhaltenen Plasmid transformiert wird.

15 15. Verfahren zur Herstellung des Expressionsplasmids pRH78 gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmid pRH77 gemäß Anspruch 27 mit BglII geschnitten und anschließend mit dem 263 bp langen Fragment, welches man durch Verdauen des Plasmids parpATER33 gemäß Anspruch 25 mit BglII und SphI erhält, ligiert und anschließend zur Replikation E.coli HB101
20 mit dem so erhaltenen Plasmid transformiert wird.

25 16. Verfahren zur Herstellung eines transformierten Wirtsorganismus gemäß Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Wirt, vorzugsweise ein bakterieller Wirt, mit einem Plasmid gemäß den Ansprüchen 6 bis 10, 25 oder 27 transformiert wird.

17. Verfahren zur Herstellung der Hybridinterferone gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein geeigneter bakterieller Wirtsorganismus mit genetischen Informa-

5 18. Verfahren zur Herstellung von reinen omegal-Interferonen
der Formel

					5					10						15			
					Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Asn	His	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Asn	Thr	Leu
									20						25				30
10					Val	Leu	Leu	His	Gln	Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Pro	Phe	Leu	Cys	Leu
									35						40				45
					Lys	Asp	Arg	Arg	Asp	Phe	Arg	Phe	Pro	Gln	Glu	Met	Val	Lys	Gly
									50						55				60
					Ser	Gln	Leu	Gln	Lys	Ala	His	Val	Met	Ser	Val	Leu	His	Glu	Met
									65						70				75
15					Leu	Gln	Gln	Ile	Phe	Ser	Leu	Phe	His	Thr	Glu	Arg	Ser	Ser	Ala
									80						85				90
					Ala	Trp	Asn	Met	Thr	Leu	Leu	Asp	Gln	Leu	His	Thr	Gly	Leu	His
									95						100				105
20					Gln	Gln	Leu	Gln	His	Leu	Glu	Thr	Cys	Leu	Leu	Gln	Val	Val	Gly
									110						115				120
					Glu	Gly	Glu	Ser	Ala	-XAla	Ile	Ser	Ser	Pro	Ala	Leu	Thr	Leu	
									125						130				135
					Arg	Arg	Tyr	Phe	Gln	Gly	Ile	Arg	Val	Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Lys
									140						145				150
25					Tyr	Ser	Asp	Cys	Ala	Trp	Glu	Val	Val	Arg	Met	Glu	Ile	Met	Lys
									155						160				165
					Ser	Leu	Phe	Leu	Ser	Thr	Asn	Met	Gln	Glu	Arg	Leu	Arg	Ser	Lys
									170										
30					Asp	Arg	Asp	Leu	Gly	Ser	Ser								

in der

X in Position 111 für Glu oder Gly steht, dadurch gekennzeichnet, daß rekombinant hergestelltes omega-Interferon, vorzugsweise mittels eines bakteriellen Wirts, der mit einem

- 5 Plasmid gemäß Anspruch 10 transformiert ist, mittels einer Antikörper-Affinitätssäule, enthaltend monoklonale Antikörper gegen ein Hybridinterferon gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, bestehend aus einem Teil von einem α -Interferon und aus einem Teil von einem omega-Interferon, gereinigt wird.

- 10 19. Verfahren zur Herstellung der Expressionsplasmide gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß dieses durch Ligieren des ca. 3750 bp langen HindIII-BamHI-Fragmentes aus parpATER33,

- 15 mit dem ca. 800 bp langen Fragment, das durch Verdauen eines für omegal-Interferon kodierenden Plasmids, vorzugsweise des Plasmids pRHW11 oder pRHW12, mit HindIII und BamHI erhalten wird, hergestellt wird.

- 20 20. In vitro und in vivo zu kultivierende Hybridzelllinien, dadurch gekennzeichnet, daß diese durch Zellfusion von Milzzellen einer mit einem Hybridinterferon gemäß den Ansprüchen 1 oder 2 immunisierten Maus, vorzugsweise einer BALB/c-Maus, mit Myelomzellen, vorzugsweise von Zellen der Linie P3-X-63Ag8-653, erhalten werden und Antikörper gegen diese Hybridinterferone, gegen α - und omegal-Interferon produzieren.
- 25

21. Monoklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß er die Aktivität von Humaninterferon des Typs $\alpha 2$, omegal und des Hybridinterferons gemäß Anspruch 2 ganz oder teilweise neutralisiert.

22. Verwendung der monoklonalren Antikörper gemäß Anspruch 21 zur Reinigung von einem Hybridinterferon gemäß Anspruch 1 oder 2, einem IFN- α 2 oder einem IFN- ω gal.

5 23. Verfahren zur Herstellung von neuen IgG-Antikörpern der Maus mit Anti-Humaninterferon- α 2-, - ω gal- und Anti-hybrid-interferonspezifität gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß eine die IgG-Antikörper produzierende Hybridzelllinie durch Zellfusion hergestellt und subkloniert wird, wobei zur Zellfusion Myelomzellen und Milzzellen von gegen Hybrid-
10 interferonen gemäß Anspruch 2 immunisierten Mäusen verwendet werden, und nach Wachstum der Zellen die IgG-Antikörper mit Anti-Interferonspezifität isoliert werden.

15 24. Verfahren zur Herstellung eines Antikörper-Affinitäts-trägers, dadurch gekennzeichnet, daß ein monoklonaler Antikörper gemäß Anspruch 21 kovalent an einen aktivierten Träger gebunden ist.

25 25. Plasmid parpATER33, dadurch gekennzeichnet, daß im Plasmid pAT153 das BamHI-PstI-Fragment durch das BamHI-PstI-Fragment des Plasmids parpER33 ersetzt ist, und durch die Restriktionskarte gemäß Fig. 1 charakterisiert ist.

26. Verfahren zur Herstellung des Plasmids parpATER33 gemäß Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß dieses durch Ligieren des kleineren Fragmentes, welches durch Verdauen des Plasmids parpER33 mit BamHI und PstI erhalten wird, mit dem
25 größeren Fragment, welches durch Verdauen des Plasmids pAT153 mit BamHI und PstI erhalten wird, hergestellt wird.

27. Expressionsplasmid pRH77, dadurch gekennzeichnet, daß im Plasmid pRHW13 oder pRHW14 das große SphI-BglII-Fragment mit dem kleinen SphI-BglII-Fragment des Plasmids parpATER33
30 ligiert ist, und durch die Restriktionskarte gemäß Fig. 5 charakterisiert ist.

0236920

28. Verfahren zur Herstellung des Expressionsplasmids pRH77
gemäß Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß das große
Fragment, das man durch Verdauen eines Plasmids gemäß An-
spruch 10 mit BglIII und SphI erhält, mit dem kleinen Frag-
5 ment, das man durch Verdauen des Plasmids parpATER33 gemäß
Anspruch 25 mit BglIII(2) und SphI erhält und welches für den
C-Terminus des IFN- α 2(Arg) kodiert, ligiert und ein bak-
terieller Wirt mit dem so erhaltenen Plasmid anschließend
transformiert wird.

Fig. 1

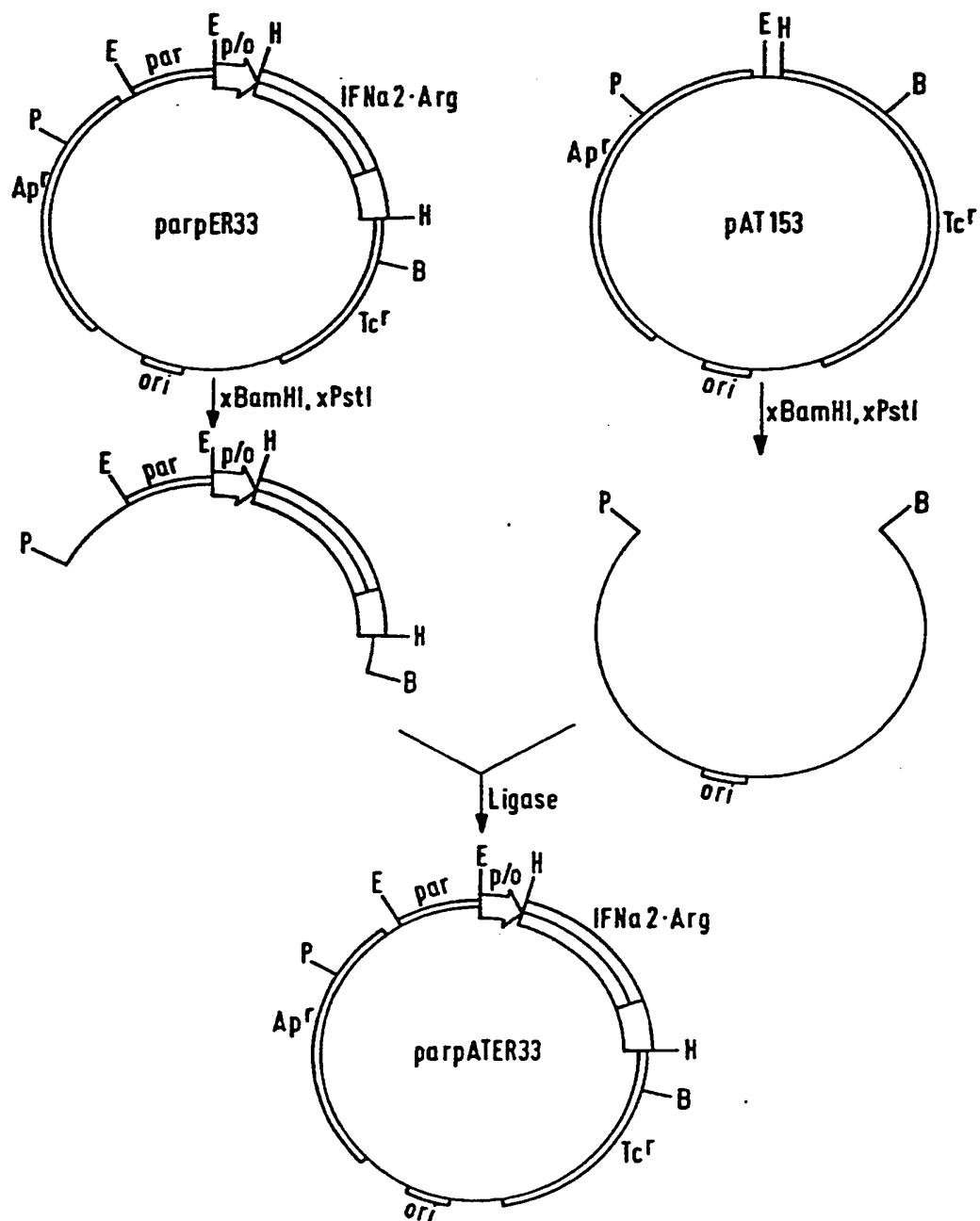


Fig. 2

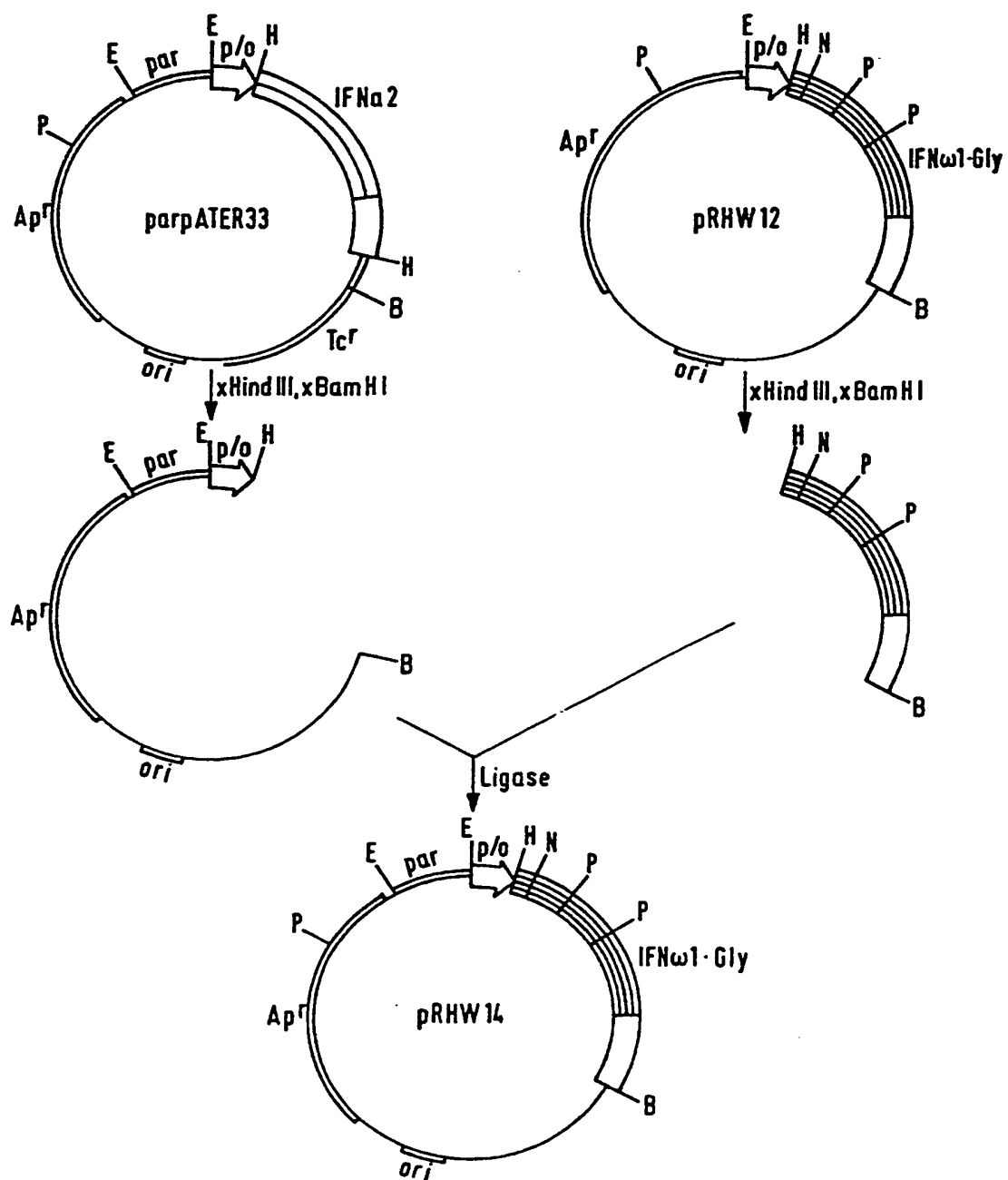


Fig. 3

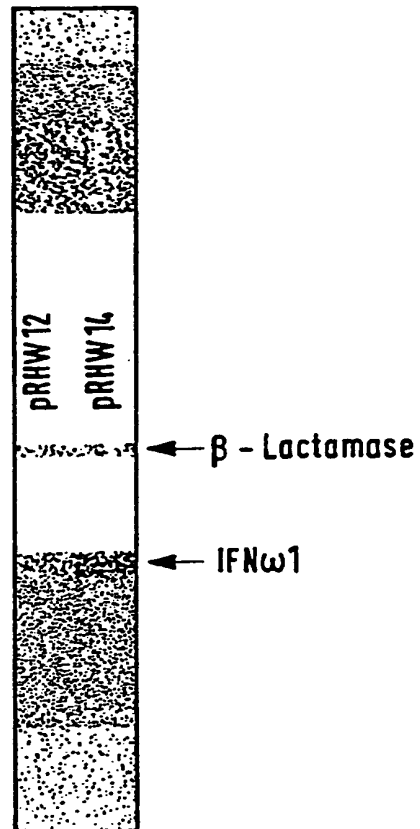


Fig. 4

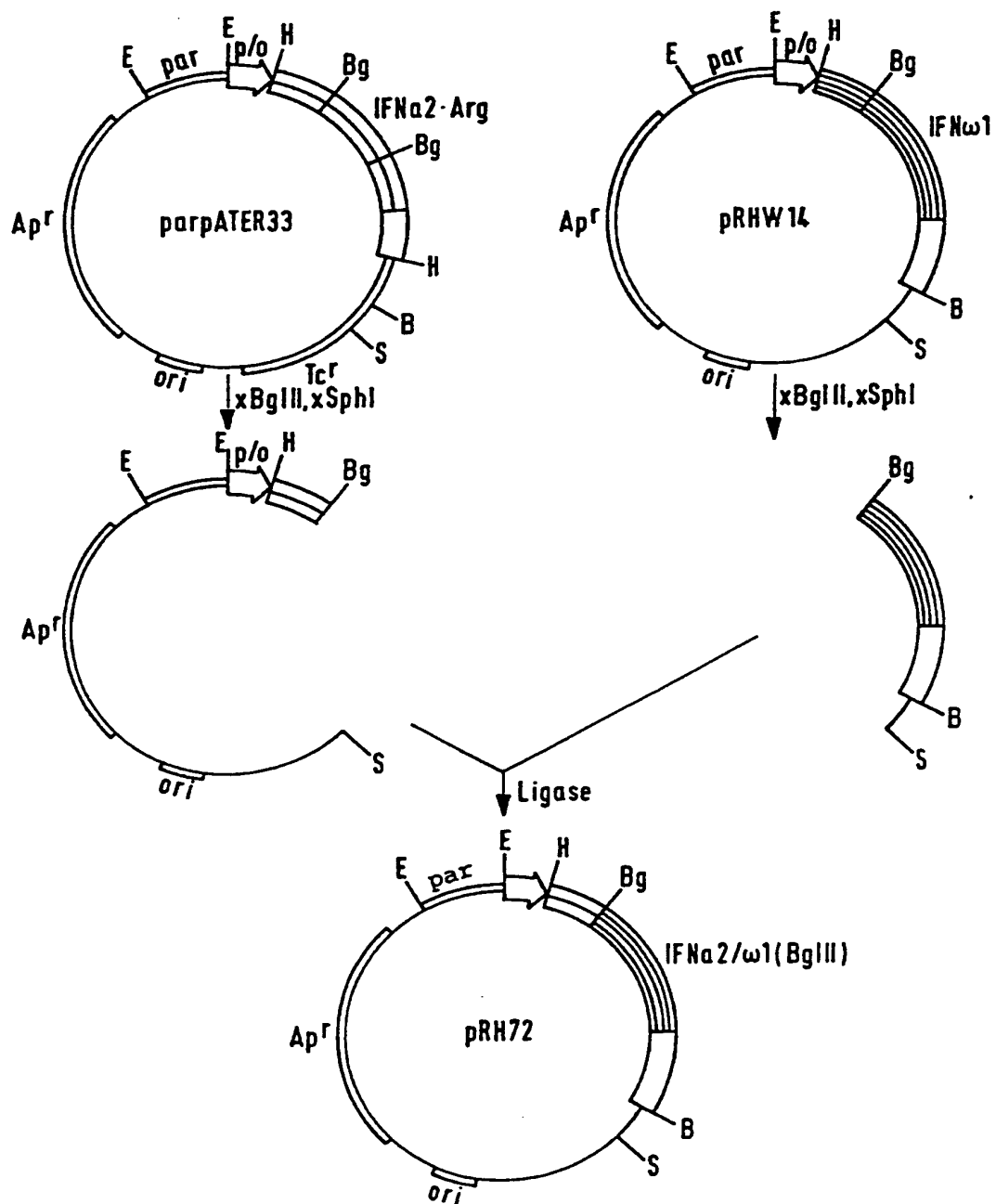


Fig. 5

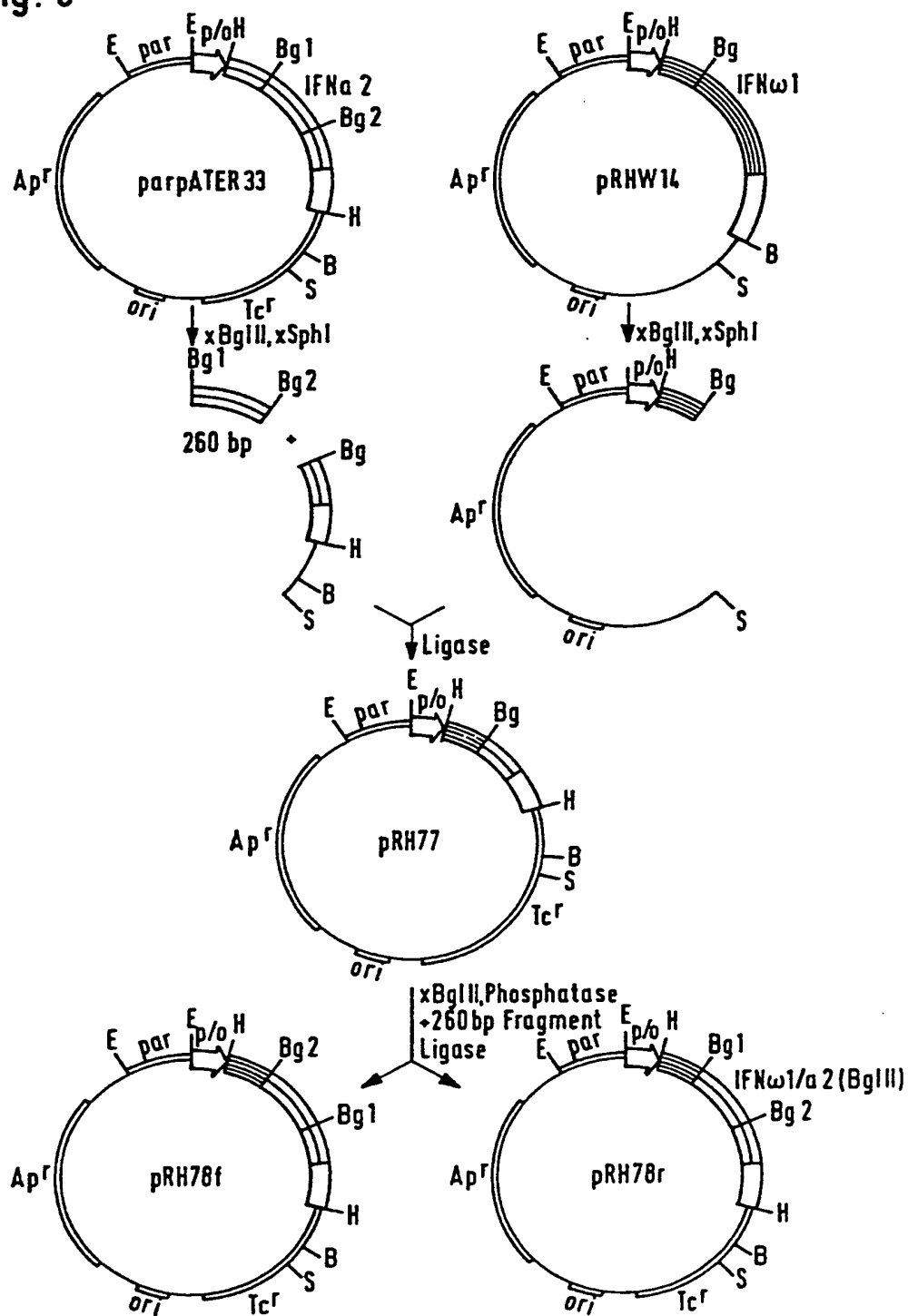


Fig. 6

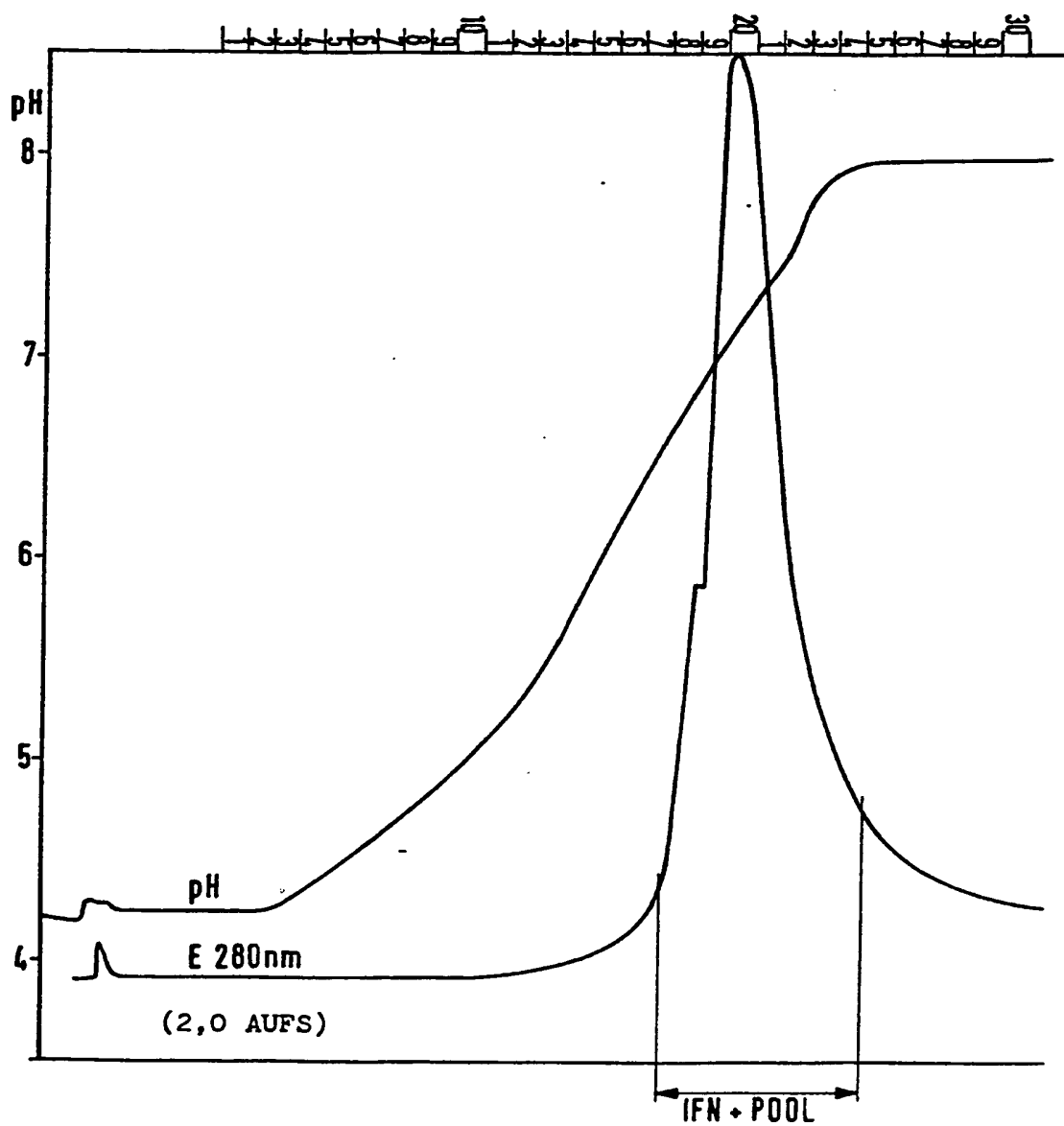


Fig. 7

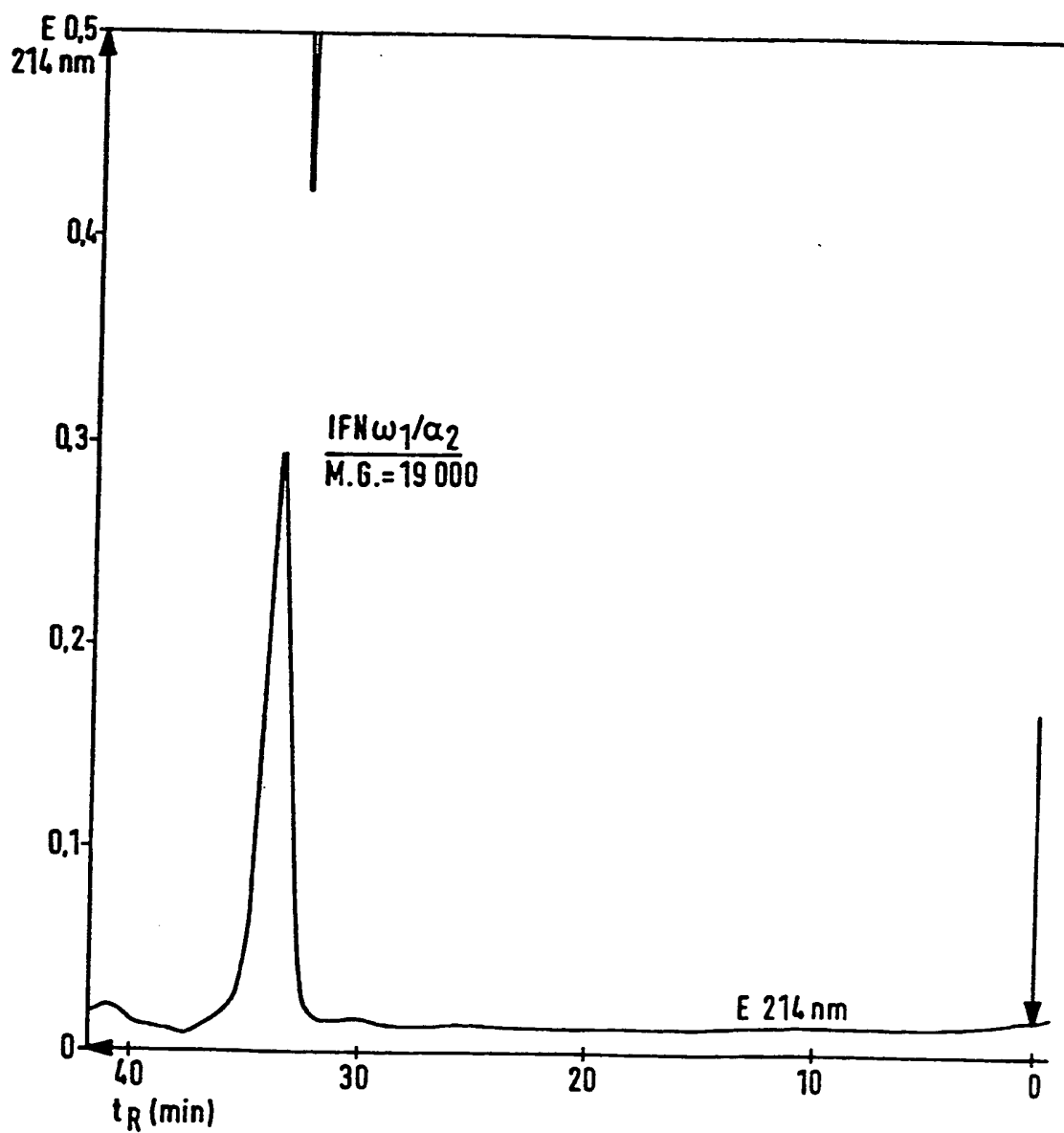
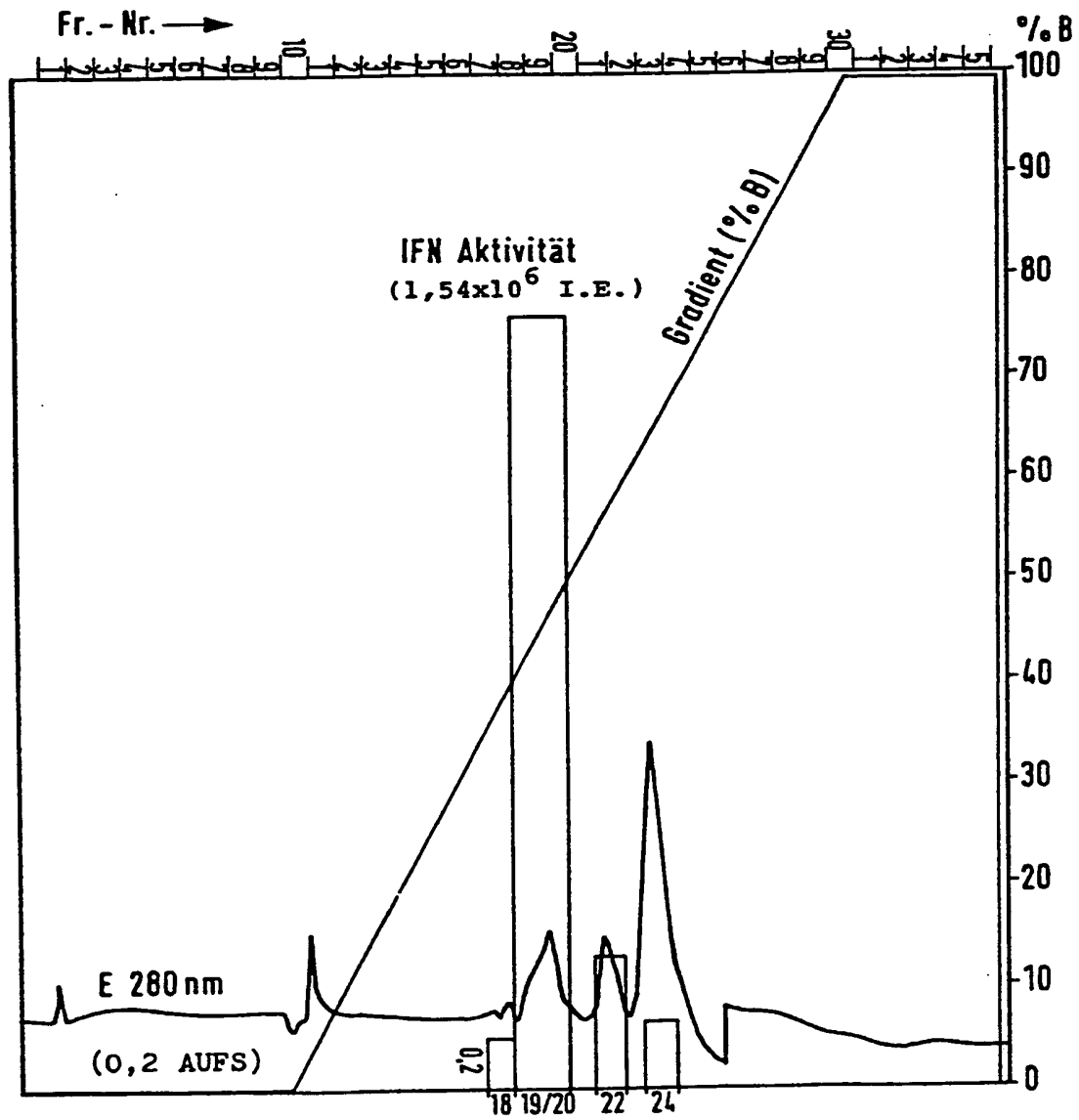


Fig. 8



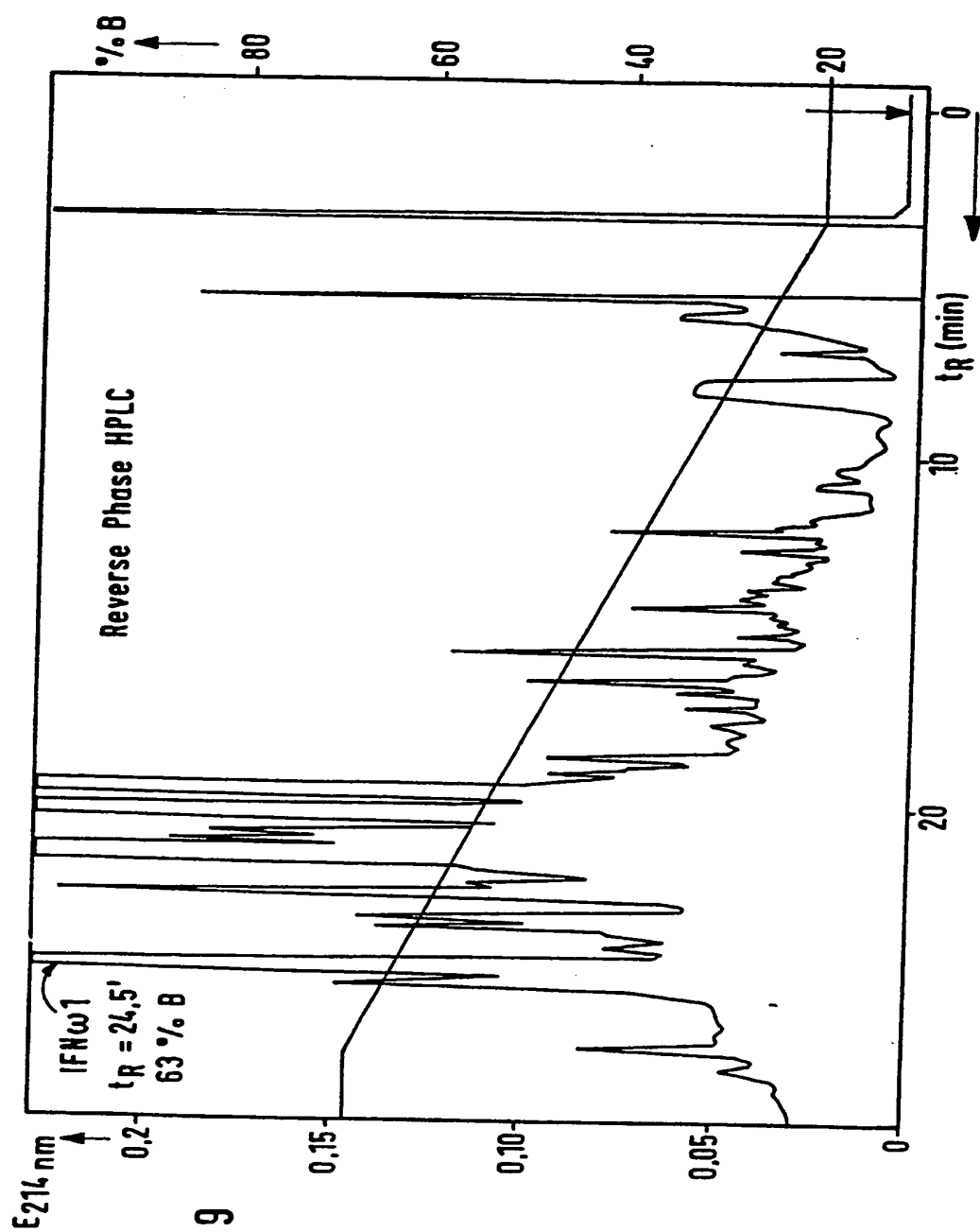


Fig. 9